Fisiología de la Conducta
Neil R. Carlson
8a Edición
Pearson Education
2005

capítulo 5

Métodos y estrategias de investigación



Bridget Riley, *Nataraha*, 1993. © Bridget Riley. © Tate Gallery, London/Art Resource, NY.

resumen

Como se comentó en el capítulo 4, hace unos veinte años varios jóvenes se inyectaron una droga ilícita que estaba contaminada con MPTP, una sustancia que destruyó las neuronas dopaminérgicas de su sistema nigroestriatal. Consecuentemente presentaron un cuadro grave de Parkinson. El trasplante de neuronas fetales, un método neuroquirúrgico experimental para tratar el Parkinson, ha resultado ser prometedor. El fundamento de este procedimiento es el siguiente: los síntomas de Parkinson, ya sean los de la enfermedad de Parkinson o los de los efectos tóxicos del MPTP, se deben a la falta de dopamina en los ganglios basales —especialmente en el núcleo caudado y el putamen—. Por el momento no se puede inducir en el encéfalo la regeneración de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal. Sin embargo, sí se pueden implantar neuronas secretoras de dopamina en el núcleo caudado y el putamen, y si éstas sobreviven y segregan dopamina, entonces tal vez los síntomas de Parkinson disminuyan. Dado que las neuronas implantadas han de ser saludables y resistentes y no desencadenar la reacción del sistema inmune del receptor, lo más razonable es obtenerlas de fetos humanos abortados —o, quizá algún día, de cultivos de hemocitoblastos (células madre) que han sido inducidos a convertirse en neuronas secretoras de dopamina—.

Al menos a uno de los afectados por la intoxicación con MPTP se le realizó este tipo de trasplante (llamémosle Sr. B.). Antes de que tuviera lugar la intervención, se le inyectó L-dopa radiactiva, sustancia precursora de dopamina. Luego, una hora más tarde, se le condujo a una pequeña sala en la que había un equipo de TEP. Se le puso la cabeza en el interior del aparato y durante varios minutos la máquina obtuvo datos de los positrones que se emitían, en forma de partículas radioactivas, en su perturbada cabeza.

Unas cuantas semanas después, el Sr. B. ingresó en el hospital para su intervención quirúrgica. Los técnicos extirparon las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de varios fetos abortados y las prepararon para trasplantarlas al cerebro del Sr. B. Éste estaba anestesiado y el cirujano le hizo unas incisiones en el cuero cabelludo para dejar al descubierto partes del cráneo. Unió el armazón de un aparato estereotáxico a su cráneo, tomó algunas medidas y luego taladró varios orificios. Utilizó el aparato estereotáxico para dirigir la inyección de neuronas fetales al núcleo caudado y el putamen del Sr. B. Una vez realizada la inyección, el cirujano retiró el armazón estereotáxico e hizo puntos de sutura en las incisiones que había hecho en el cuero cabelludo.

La operación tuvo un éxito considerable: el Sr. B. recuperó en gran parte el control motor. Poco más de un año después se le volvió a inyectar L-dopa radiactiva y de nuevo se le puso la cabeza en el aparato de escáner por TEP. Los resultados del segundo escáner revelaron lo que significaba su recuperación: las células habían sobrevivido y estaban segregando dopamina.

El estudio de la fisiología de la conducta implica el esfuerzo de científicos de muchas disciplinas científicas, incluyendo la fisiología, la neuroanatomía, la bioquímica, la psicología, la endocrinología y la histología. Llevar a cabo un proyecto de investigación en Neurociencia comportamental requiere dominar muchas técnicas experimentales. Puesto que diferentes procedimientos llevan a menudo a resultados contradictorios, los investigadores han de estar familiarizados con las ventajas y las limitaciones de los métodos que emplean. La investigación científica conlleva un proceso de cuestionarse cuál es la naturaleza de los fenómenos. El método que se utiliza enmarca la cuestión. Con frecuencia se obtiene una respuesta que extraña, hasta que más tarde se cae en la cuenta de que no se estaba planteando la pregunta correcta. Como se verá, las mejores conclusiones sobre la fisiología de la conducta no se extraen de un único experimento, sino de un programa de investigación que permite comparar los resultados de estudios que abordan el mismo problema con métodos diferentes.

Los investigadores disponen de una enorme —y sorprendente— serie de métodos de investigación. Si se presentara aquí tan sólo un inventario de ellos, no sería de sorprender que el lector se perdiera —o simplemente perdiera interés—. En vez de ello, se presentarán únicamente los procedimientos más importantes y utilizados con mayor frecuencia, estructurados en torno a unos cuantos problemas que han estudiado los investigadores. De esta manera, debería resultar más fácil darse cuenta del tipo de información que aportan los diversos métodos de investigación y entender sus ventajas y desventajas. También permitirá describir las tácticas de las que se valen los investigadores cuando siguen examinando los resultados de un experimento diseñando y realizando otro.

Ablación experimental

Uno de los principales métodos de investigación utilizados para estudiar las funciones cerebrales requiere destruir una parte del encéfalo y evaluar la conducta subsecuente del animal. Este método se denomina **ablación experimental**

ablación experimental Extirpación o destrucción de una parte del encéfalo de un animal de laboratorio; supuestamente, las funciones que ya no pueden ejecutarse son las que controlaba previamente la región.

(del término latino *ablatus*, «llevarse»). En la mayoría de los casos, dicha técnica no implica extraer el tejido cerebral, en vez de ello el investigador destruye algo de tejido y lo deja en su sitio. La ablación experimental es el más antiguo de los métodos utilizado en Neurociencia, y sigue siendo uno de los más importantes.

Evaluación de los efectos comportamentales del daño cerebral

Una *lesión* es una herida o un traumatismo, y un investigador que destruye una parte del cerebro por lo general describe el daño como una *lesión cerebral*. Los experimentos en los que se daña una parte del encéfalo y después se observa la conducta del animal se llaman **estudios de lesión**. Su fundamento teórico es que el funcionamiento de un área cerebral puede deducirse basándose en las conductas que el animal ya no puede realizar después de que se haya destruido dicha área. Por ejemplo, si después de que se haya destruido parte del encéfalo un animal ya no puede llevar a cabo tareas que requieren poder ver, se puede concluir que el animal está ciego —y que el área dañada desempeña alguna función en la visión—.

Se ha de ser precavido al interpretar los efectos de las lesiones cerebrales. Por ejemplo, ¿cómo se puede estar seguro de que el animal está ciego? ¿Choca contra los objetos, o no logra recorrer un laberinto en dirección a la luz que indica dónde está la comida, o ya no contrae las pupilas ante la luz? Un animal puede chocar contra los objetos debido a una deficiente coordinación motora, puede haber perdido el apetito de comer (y por tanto su motivación para recorrer el laberinto), o puede ver bastante bien pero haber perdido los reflejos visuales. A menudo los investigadores pueden equivocarse. Hace años pensaban que las ratas albinas eran ciegas. (No lo son). Reflexionemos sobre ello: ¿cómo se comprobaría si una rata puede ver? Recuérdese que las ratas tienen vibrisas (bigotes) que pueden utilizarse para detectar una pared antes de chocar con ella o con el borde de una mesa antes de caerse de ésta. También pueden encontrar su camino en una habitación guiándose por pistas olfativas.

¿Qué es en realidad lo que se puede aprender de los estudios de lesión? El objetivo es descubrir cuáles son las funciones que realizan las diferentes regiones cerebrales y luego entender cómo se combinan estas funciones para dar lugar a determinadas conductas. La distinción entre *función cerebral* y *conducta* es importante. Los circuitos que hay en el encéfalo efectúan funciones, no conductas. Ninguna región cerebral o circuito neural es el único responsable de una conducta; cada región efectúa una función (o una serie de funciones) que contribuye a la ejecución de la conducta. Por ejemplo, el acto de leer implica funciones que requieren controlar los movimientos oculares, enfocar la lente del ojo, percibir y reconocer palabras y letras, comprender el significado de las palabras, etc. Algunas de estas funciones participan también en otras conductas; por ejemplo, el control del movimiento de los ojos y del enfoque se necesitan para cualquier tarea que requiera mirar; y los mecanismos cerebrales que se utilizan para comprender el significado de las palabras participan también en la comprensión del habla. La tarea del investigador es comprender cuáles son las funciones que se necesitan para llevar a cabo una conducta específica y determinar cuáles son los circuitos de neuronas cerebrales responsables de cada una de esas funciones.

Pongamos un ejemplo de cómo los investigadores intentan deducir la naturaleza de las funciones realizadas por diversas partes del cerebro. Los circuitos neurales que se localizan en la corteza que recubre el lóbulo parietal ejecutan funciones relacionadas con la percepción espacial y la memoria. Las lesiones en esta región alteran la capacidad de las personas para leer o dibujar mapas, para recordar la localización de objetos que acaban de ver, etc. Además, quienes sufren lesiones en el lóbulo parietal suelen tener dificultades para hacer cálculos aritméticos. A primera vista, no parece haber una relación entre este déficit y las funciones espaciales del lóbulo parietal, pero en realidad están relacionados casi con toda seguridad. Para demostrárselo a sí mismo, intente multiplicar 55 por 12 sin papel ni lápiz. Cierre los ojos y dedíquese a ello durante un rato. Intente analizar cómo lo hizo.

La mayoría de las personas dicen que intentan imaginarse los números puestos uno encima del otro, como los estarían si utilizaran papel y lápiz. En otras palabras, «escriben» el problema en su mente. Al parecer, la lesión del lóbulo parietal dificulta poner cada número en un lugar determinado en un «espacio» imaginario y recordar en qué lugar estaba.

La interpretación de los datos de los estudios de lesión se complica por el hecho de que todas las regiones del encéfalo están interconectadas. Supóngase que uno conoce bien las funciones requeridas para que se lleve a cabo una determinada conducta. Descubre que la lesión de la estructura X altera una determinada función. ¿Ha de concluir forzosamente que los circuitos neuronales localizados en dicha estructura realizan una función esencial en esa conducta? Por desgracia, no. Puede que, de hecho, la función que interesa sea llevada a cabo por circuitos neurales que se localizan en otra parte del encéfalo. Puede que el daño de la

estudio de lesión Sinónimo de ablación experimental.

estructura X tan sólo interfiera en el normal funcionamiento de los circuitos neurales de la estructura X:

Véamos un ejemplo concreto para ilustrar este inconveniente. La lesión de una parte del cerebro (el área septal) altera por completo la conducta maternal de un roedor hembra. El animal no construye un nido para sus crías ni las agrupa a todas en un lugar y las alimenta. Como consecuencia, éstas acaban dispersas por toda la jaula, y finalmente pueden morir de hambre, a menos que el experimentador las rescate, entregándoselas a una madre adoptiva. ¿Cuál es la función del área septal, que resulta tan vital para la conducta maternal normal? Lo que sucede es que una conexión entre el área septal y la formación hipocampal controla la actividad de esta última —activa o desactiva ciertas funciones del hipocampo—. Entre tales funciones figuran algunas de las necesarias para que los animales perciban su localización en el espacio. Cuando se lesiona el área septal, dichas funciones quedan permanentemente desactivadas. Así pues, es bastante probable que el que no se den las conductas de construcción de nido y de agrupar a las crías se deba a la desorganización de la percepción espacial de la madre. El área septal no interviene directamente en la percepción espacial, pero debido a que controla circuitos neurales situados en el hipocampo, su lesión afecta a la conducta maternal.

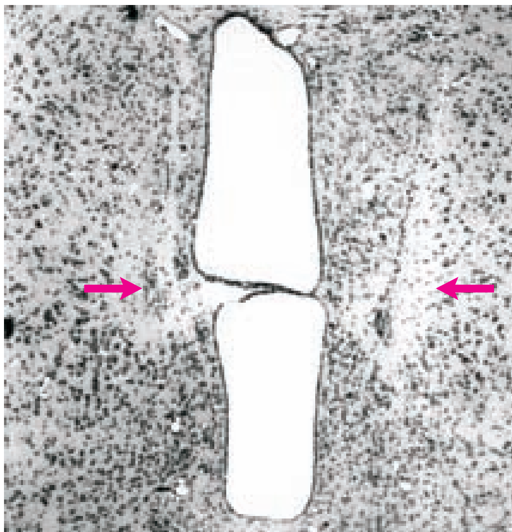


figura 5.1

Lesión por radiofrecuencia. Las flechas señalan las minúsculas lesiones producidas por el paso de corriente de radiofrecuencia a través de los extremos de electrodos de acero inoxidable, situados en el núcleo preóptico medial del encéfalo de una rata (Sección frontal, tinción de cuerpos celulares.)

(De Turkenburg, J. L.; Swaab, D. F.; Endert, E.; Louwerse, A. L. y van de Poll, N. E. *Brain Research Bulletin*, 1988, 21, 215-224.)

Producción de lesiones cerebrales

¿Cómo se efectúan las lesiones cerebrales? Destruir las partes del encéfalo que se encuentran justo debajo del cráneo es fácil: se anestesia al animal, se corta el cuero cabelludo, se extrae una parte del cráneo y se corta la duramadre, dejando al descubierto la corteza. Se puede utilizar entonces un dispositivo de succión para aspirar el tejido cerebral. El tejido cerebral se extirpa situando una pipeta de vidrio sobre la superficie del encéfalo y succionando el tejido mediante una bomba de vacío unida a la pipeta.

Lo más frecuente es que la región que se quiere destruir esté oculta en el interior del encéfalo. Las lesiones cerebrales de regiones subcorticales —regiones localizadas debajo de la corteza— se realizan por lo general haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un electrodo de acero inoxidable que, salvo en la punta, está cubierto de un barniz aislante eléctrico. Se guía el electrodo siguiendo un método estereotáxico, de modo que su extremo llegue al lugar adecuado. (La cirugía estereotáxica se describe en el próximo subapartado). Luego, se conecta el aparato de producir lesiones, que produce una corriente de radiofrecuencias (RF) —corriente alterna de frecuencia muy elevada—. El paso de la corriente a través del tejido cerebral produce una alta temperatura, que destruye las células cercanas a la región que rodea la punta del electrodo (véase **la *figura 5.1***).

Las lesiones producidas con este método destruyen todo lo que se encuentra en la vecindad de la punta del electrodo, incluyendo los somas neuronales y los axones de las neuronas que atraviesan la región. Un método más selectivo de producir lesiones cerebrales es emplear un aminoácido excitatorio como el *ácido caínico*, que destruye las neuronas estimulándolas hasta que mueren. (Como se vio en el capítulo 4, el ácido caínico estimula los receptores glutamatérgicos). A este tipo de lesiones se les llama **lesiones excitotóxicas**. Cuando se inyecta a través de una cánula un aminoácido excitatorio en una región cerebral, la sustancia destruye los somas celulares vecinos pero respeta a los axones de las diferentes neuronas que pasan por los alrededores (véase la ***figura 5.2***). Esta selectividad le permite al investigador determinar si los efectos comportamentales de la destrucción de una estructura cerebral concreta se deben a la muerte de las neuronas que allí se localizan o a la lesión de los axones de paso. Por ejemplo, unos investigadores descubrieron que las lesiones por RF de una región determinada del tronco del encéfalo abolían el sueño REM, por lo tanto creyeron que esa región

Lesión excitotóxica Lesión cerebral producida por inyección intracerebral de un aminoácido excitatorio, tal como el ácido caínico.

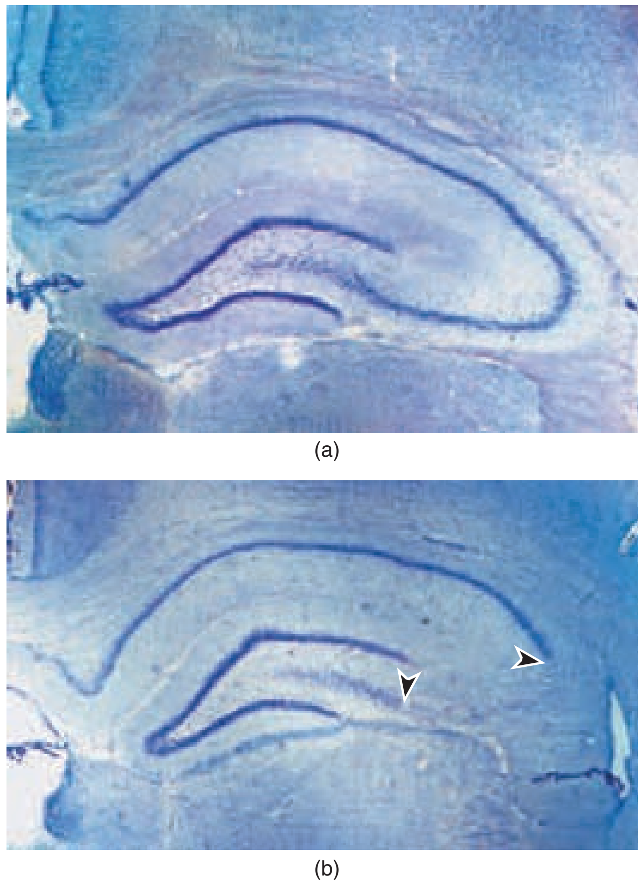


figura 5.2

Lesión excitotóxica. (a) Sección a través del hipocampo del encéfalo de una rata normal. (b) Lesión producida por la infusión de un aminoácido excitatorio en una región del hipocampo. Las puntas de flecha señalan los límites de la región en la que se han destruido las neuronas. (Cortesía de Benno Roozendaal, Universidad de California, Irvine.)

participaba en la generación de dicha fase del sueño. (El sueño REM es la fase del sueño en la que tienen lugar los ensueños). Pero estudios posteriores demostraron que cuando se utiliza ácido caínico para destruir las neuronas que contiene esa región, el sueño de los animales no resulta afectado. De modo que las lesiones por RF debieron alterar el sueño al destruir los axones que atraviesan el área.

Se dispone de métodos para producir lesiones todavía más específicos. Por ejemplo, la **6-hidroxidopamina** (6-HD) es similar a las catecolaminas noradrenalina y dopamina. Debido a esta semejanza, la 6-HD es captada por los transportadores de moléculas de los axones y los botones terminales de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Una vez dentro, la sustancia intoxica y destruye las neuronas. Así, la 6-HD puede inyectarse directamente en regiones determinadas del encéfalo para eliminar poblaciones específicas de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas.

Repárese en que cuando se producen lesiones subcorticales mediante corriente de RF a través de un electrodo o por infusión de una sustancia química a través de una cánula, siempre se causan daños adicionales en el encéfalo. Cuando se introduce un electrodo o una cánula en el encéfalo para alcanzar el objetivo que se pretende, inevitablemente se produce un cierto grado de lesión incluso antes de activar el dispositivo de lesión o de iniciar la infusión. Por lo tanto, uno no se puede limitar a comparar la conducta de los animales lesionados con la de animales de referencia no operados; el daño asociado producido en las regiones cerebrales situadas por encima de la lesión puede, de hecho, ser lo que causa alguno de los déficits comportamentales que se observan. Lo que se hace es operar a un grupo de animales y producirles **lesiones falsas** *(sham).* Para ello, se anestesia a cada animal, se le coloca en el aparato estereotáxico (descrito más adelante), se le abre el cuero cabelludo, se le trepana el cráneo y se inserta el electrodo o la cánula, haciendo que penetren hasta la profundidad adecuada. En otras palabras, se hace lo mismo que se haría para producir la lesión, excepto activar el dispositivo de lesión o iniciar la infusión. Este grupo de animales sirve de grupo de referencia; si la conducta de los animales con una lesión cerebral es diferente de la de los animales de referencia con una lesión falsa, se puede concluir que las lesiones son responsables de los déficits comportamentales. (Como se puede advertir, una lesión falsa cumple el mismo cometido que un tratamiento placebo en los estudios farmacológicos).

La mayoría de las veces, los investigadores producen lesiones cerebrales permanentes, pero en algunas ocasiones resulta provechoso impedir temporalmente la actividad de una determinada región del encéfalo. La forma más sencilla de hacerlo es inyectar un anestésico local o un fármaco llamado *muscimol* en el lugar adecuado del encéfalo. El anestésico bloquea los potenciales de acción en los axones que entran o salen de esa región, y es eficaz para producir una lesión temporal (llamada corrientemente lesión cerebral *reversible*). El muscimol, un fármaco que estimula los receptores GABA, inactiva una región del encéfalo inhibiendo a las neuronas allí localizadas. (Se recordará que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el encéfalo). Las lesiones reversibles también pueden conseguirse enfriando el tejido nervioso lo

6 hidroxidopamina (6-HD) Sustancia que es captada selectivamente por los axones y los botones terminales de las neuronas noradrenérgicas o dopaminérgicas y actúa como una toxina, dañándolas o destruyéndolas.

lesión falsa Procedimiento «placebo» que reproduce todos los pasos de realización de una lesión cerebral salvo el que realmente la causa.



figura 5.3

Criodo, instrumento que produce lesiones temporales en la corteza cerebral. El instrumento se implanta quirúrgicamente entre el cráneo y el encéfalo, y la lesión temporal puede producirse mientras el animal está despierto y alerta. Se hace circular un líquido frío a través de los tubos de acero inoxidable. El criodo que se ve en la fotografía se colocó en una región de la corteza visual de asociación del hemisferio izquierdo del encéfalo de un mono.
(Cortesía de James Horel, *SUNY Upstate Medical Center.*

suficiente para suprimir la actividad neural. La figura 5.3 muestra un instrumento llamado *criodo*, el cual puede utilizarse para producir lesiones temporales en una región de la corteza cerebral del encéfalo del mono. El utensilio consiste en una serie de tubos de acero inoxidable a través de los cuales puede hacerse circular un líquido enfriado. Se implanta entre el cráneo y la superficie del encéfalo (véase la ***figura 5.3***).

Cirugía estereotáxica

¿Cómo puede situar la punta de un electrodo o una cánula en un lugar preciso del interior del encéfalo de un animal? La respuesta es mediante **cirugía estereotáxica**. *Stereotaxis* significa literalmente «disposición sólida»; en concreto, se refiere a la capacidad de localizar objetos en el espacio. Un *aparato estereotáxico* consta de un soporte, que inmoviliza la cabeza del animal en una posición establecida, y un brazo que desplaza el electrodo o la cánula en los tres ejes espaciales a lo largo de distancias cuantificables. No obstante, para realizar una intervención estereotáxica primero se ha de consultar un *atlas estereotáxico.*

cirugía estereotáxica Cirugía cerebral que utiliza un aparato estereotáxico para situar un electrodo o una cánula en un lugar específico del encéfalo.

bregma Confluencia de las suturas sagital y coronal del cráneo; suele utilizarse como punto de referencia en cirugía estereotáxica cerebral.

El atlas estereotáxico

No existen dos encéfalos de animales de una determinada especie que sean completamente idénticos, pero la semejanza entre los individuos es suficiente para predecir la localización de una estructura cerebral concreta respecto a las características externas de la cabeza. Por ejemplo, un núcleo subcortical de la rata puede estar a tantos milímetros en los planos ventral, anterior y lateral de un punto formado por la confluencia de varios huesos del cráneo. La figura 5.4 muestra dos vistas del cráneo de una rata: un dibujo de la superficie dorsal y, debajo, una vista sagital medial (véase la ***figura 5.4***). El cráneo se compone de varios huesos que crecen juntos y forman *suturas* (puntos de unión). En la cabeza de los niños recién nacidos hay un punto blando en donde se unen las suturas sagital y coronal, llamado *fontanela.* Cuando esta abertura se cierra, la unión se denomina bregma, de la palabra griega que significa «parte anterior de la cabeza». También se observa **bregma** en el cráneo de una rata, y sirve como un útil punto de referencia. Si el cráneo del animal está orientado tal como se representa en la ilustración, una determinada región del encéfalo siempre se encuentra en una posición bastante constante en el espacio, tomando bregma como referencia.

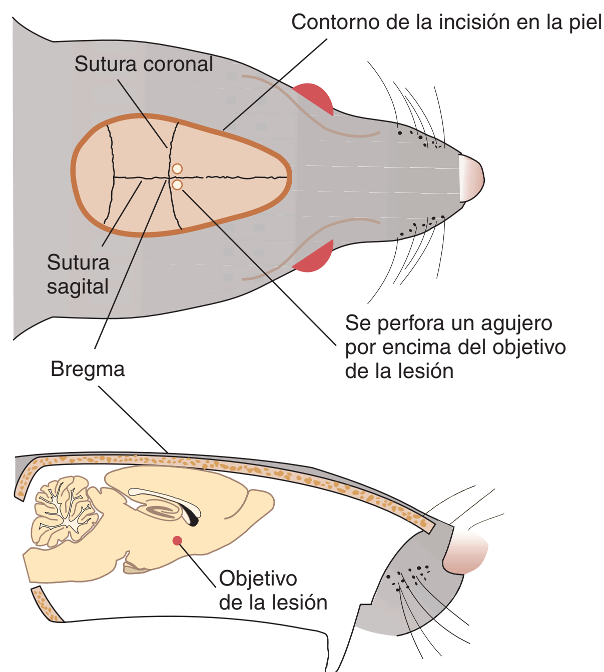


figura 5.4

Relación entre las suturas del cráneo y el encéfalo de una rata, y localización del objetivo donde situar el electrodo. *Arriba:* Vista dorsal, *Abajo:* Vista sagital medial.

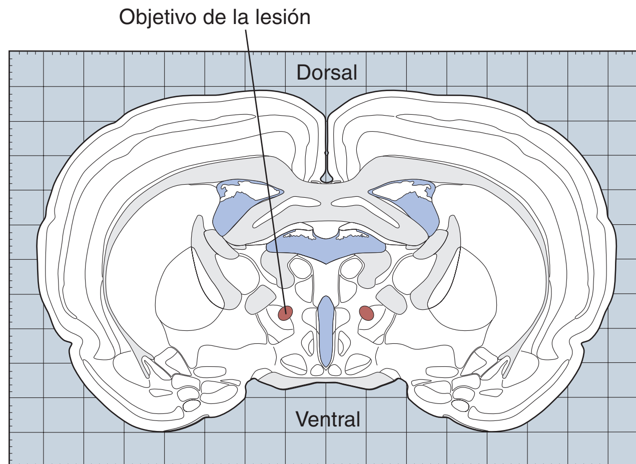


figura 5.5

Ejemplo de página de un atlas estereotáxico del encéfalo de rata. El objetivo (fórnix) se ha resaltado en rojo. Se han suprimido los rótulos identificativos para mayor claridad. (Adaptado de Swanson, L. W. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Nueva York: Elsevier, 1992.)

Un **atlas estereotáxico** incluye fotografías o esquemas que corresponden a secciones frontales, tomadas a diferentes distancias rostrales y caudales a bregma. Por ejemplo, en la página representada en la figura 5.5 hay un esquema de una sección del encéfalo en la que se halla una estructura cerebral (que se ve en rojo) que le interesa al investigador Si éste quisiera colocar la punta de un electrodo en dicha estructura (el fórnix), tendría que perforar el cráneo justo por encima de ella (véase la ***figura 5.5***). Cada página del atlas estereotáxico está identificada conforme a la distancia de la sección anterior o posterior respecto a bregma. La cuadrícula de cada página indica las coordenadas de las estructuras cerebrales en el plano ventral a la parte superior del cráneo y lateral a la línea media. Para situar la punta de un electrodo en el fórnix habría que hacer un agujero por encima del objetivo y luego bajar el electrodo por el orificio hasta que su punta esté en la profundidad correcta, en relación a la altitud del cráneo en bregma (véanse las ***figuras 5.4 y 5.5***). Así, localizando una estructura neural (que no se puede ver en el animal de experimentación) en una de las páginas de un atlas estereotáxico, se puede determinar su localización respecto a bregma (que sí se puede ver). Hay que tener en cuenta que, debido a variaciones en la cepa y edad de los animales, la localización que proporcionan los atlas es sólo aproximada. Siempre hay que probar con una nueva serie de coordenadas, seccionar y teñir el encéfalo del animal, comprobar la localización exacta de la lesión, corregir los valores y volver a intentarlo. (Los métodos de sección y tinción cerebral se describirán más adelante.)

El aparato estereotáxico

Un **aparato estereotáxico** funciona según principios sencillos. El dispositivo incluye un soporte para la cabeza, que mantiene el cráneo del animal en la ubicación adecuada, un soporte para el electrodo y un mecanismo de graduación por el se mueve este último soporte en distancias ponderadas a lo largo de los tres ejes espaciales: anterior-posterior, dorsal-ventral y lateral-medial. En la figura 5.6 se presenta un aparato estereotáxico diseñado para animales pequeños; se pueden utilizar varios tipos de soportes de cabeza con el fin de adaptar este instrumento a diferentes especies, como ratas, ratones, hámsteres, palomas y tortugas (véase la ***figura 5.6***).

Una vez que se han obtenido las coordenadas estereotáxicas a partir de un atlas estereotáxico, se anestesia al animal, se le coloca en el aparato y se le hace una incisión en el cuero cabelludo. Se localiza bregma, se marcan los números apropiados en el aparato de estereotaxia, se taladra el cráneo y se introduce el dispositivo en el encéfalo hasta las coordenadas correctas. Ahora la punta de la

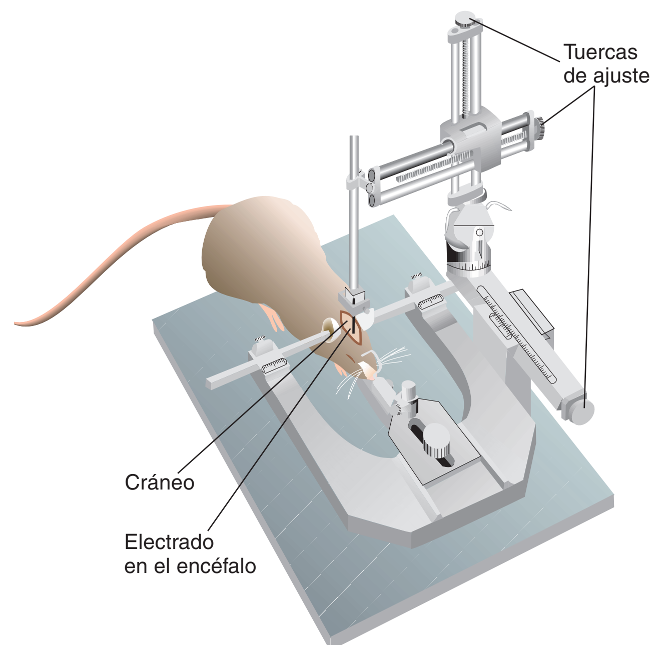


figura 5.6

Aparato estereotáxico para realizar cirugía cerebral en ratas.

atlas estereotáxico Recopilación de esquemas de secciones del encéfalo de un determinado animal con medidas que proporcionan las coordenadas para realizar la cirugía estereotáxica.

aparato estereotáxico Dispositivo que permite al cirujano situar un electrodo o una cánula en un lugar específico del encéfalo.

cánula o del electrodo está donde se quería que estuviese y se puede practicar la lesión.

Evidentemente, la cirugía estereotáxica puede utilizarse para otros fines distintos que producir lesiones. Los electrodos situados en el encéfalo pueden emplearse tanto para estimular neuronas como para destruirlas, y se pueden inyectar fármacos que estimulen neuronas o bloqueen receptores específicos. Se pueden implantar cánulas o electrodos permanentes, siguiendo un procedimiento que se describirá luego en este capítulo. En cualquier caso, una vez finalizada la intervención quirúrgica, se cose la herida, se retira al animal del aparato estereotáxico y se deja que se recupere de la anestesia.

A propósito, también hay aparatos estereotáxicos para seres humanos. A veces, los neurocirujanos efectúan lesiones subcorticales —por ejemplo, para reducir los síntomas de la enfermedad de Parkinson—. Por lo general, se valen de múltiples puntos de referencia y verifican la localización del electrodo (o de otro dispositivo) insertado en el encéfalo tomando imágenes de RM antes de producir la lesión cerebral (véase la ***figura 5.7***).

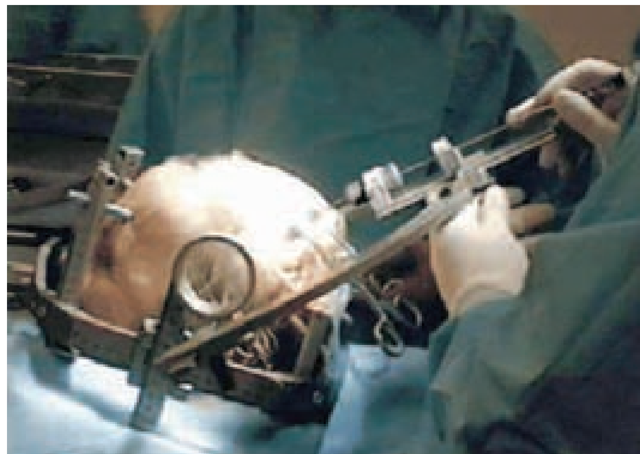


figura 5.7

Cirugía estereotáxica en un paciente humano.

(Fotografía por cortesía de John W. Snell, Departamento de Cirugía Neurológica, Universidad de Virginia).

Métodos histológicos

Después de haber producido una lesión cerebral. y observado sus efectos en la conducta del animal, hay que seccionar y teñir el tejido cerebral de modo que se pueda inspeccionar con el microscopio y localizar el lugar de la lesión. A menudo, las lesiones cerebrales yerran su objetivo, por lo que hay que verificar la localización exacta del daño cerebral después de examinar el comportamiento del animal. Para ello se necesita fijar, seccionar, teñir y examinar el encéfalo. Tomados en conjunto, estos procedimientos se denominan *métodos histológicos.* (El prefijo *histo-* hace alusión al tejido corporal).

Fijación y obtención de secciones

Si se pretende estudiar el tejido tal como era en el momento de la muerte del organismo, se han de destruir las enzimas autolíticas (*autólisis* significa «autodisolución»), o de lo contrario éstas convertirán al tejido en una masa deforme. También ha de mantenerse el tejido en buenas condiciones para evitar que se descomponga por la acción de bacterias o mohos. Con el fin de lograr estos dos objetivos, se sumerge el tejido neural en un **fijador**. El que más frecuentemente se utiliza es la **formalina**, solución acuosa de formaldehído, un gas. La formalina detiene la autólisis, endurece el tejido, que es extremadamente blando y frágil, y elimina cualquier microrganismo que pudiera destruirlo.

Antes de fijar el encéfalo (es decir, de ponerlo en una solución fijadora), por lo general se perfunde. La **perfusión** del tejido (literalmente, «fluir a través de») supone extraer la sangre y sustituirla con otro líquido. El encéfalo del animal se perfunde porque se obtienen mejores resultados histológicos cuando no hay sangre en el tejido. El animal cuyo encéfalo va a estudiarse se sacrifica humanitariamente mediante una sobredosis de un anestésico general. Se abren los vasos sanguíneos de forma que se puedan vaciar de sangre, reemplazándola por una solución salina diluida. Se extrae el encéfalo del cráneo y se coloca en un recipiente que contiene el fijador.

Una vez fijado el encéfalo, hay que seccionarlo en delgadas láminas y teñir diversas estructuras celulares con el fin de examinar pormenorizadamente su estructura. Las secciones se efectúan con un **microtomo** (literalmente, «aquello que corta en finas láminas»). Característicamente, las secciones que se preparan para examinarlas al microscopio óptico tienen un grosor de 10 a 80 μm; las que se preparan para el microscopio electrónico, por lo general menos de 1 μm. (Por ciertas razones, los cortes de tejido cerebral se denominan *secciones*).

Un microtomo consta de tres partes: una cuchilla, una plataforma en donde colocar el tejido, y un mecanismo que hace avanzar la cuchilla (o la plataforma) lo justo después de cada corte, de modo que pueda hacerse otra sección. En la mayoría de los casos, la plataforma

fijador Sustancia química, como la formalina; se utiliza para preparar y conservar tejido corporal.

formalina Solución acuosa del gas formaldehído; el fijador tisular utilizado más frecuentemente.

perfusión Proceso por el cual se reemplaza la sangre de un animal por un fluido tal como una solución salina o un fijador con el fin de preparar al encéfalo para un examen histológico.

microtomo Instrumento con el que se obtienen láminas muy finas de tejidos corporales.

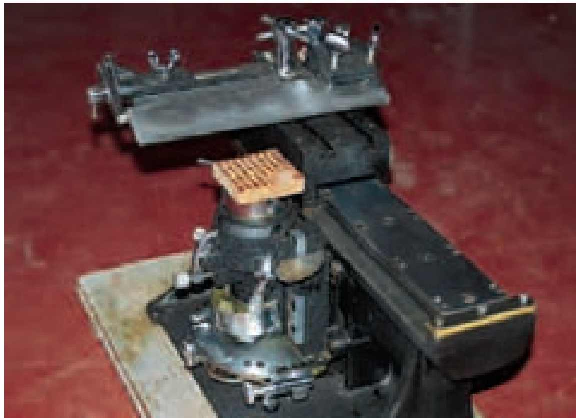


figura 5.8

Microtomo.

incluye un accesorio que congela el encéfalo, endureciéndolo lo suficiente para poder cortarlo en finas secciones. En la figura 5.8 se muestra un microtomo. El soporte de la cuchilla se desliza hacia delante sobre un riel engrasado y así se obtiene una sección de la parte superior del tejido fijado a la plataforma. Ésta sube automáticamente a una altura predeterminada cuando la cuchilla y el soporte son empujados de nuevo hacia atrás, de manera que el siguiente movimiento hacia delante de la cuchilla corta otra sección (véase la ***figura 5.8***).

Tras haber cortado el tejido, las secciones se montan sobre portaobjetos de vidrio. Éstas pueden entonces teñirse sumergiendo el portaobjetos en diversas soluciones químicas. Por último, las secciones teñidas se cubren con una pequeña cantidad de líquido transparente, conocido como *medio de preparación*, y se coloca una lámina de cristal muy fina (cubreobjetos) sobre ellas. El medio de preparación mantiene fijo el cubreobjetos.

Tinción

Si se observa al microscopio una sección de tejido cerebral sin teñir, se podrán ver los contornos de algunas masas celulares grandes y los fascículos de fibras más destacados. Sin embargo, no se dejarán ver los detalles más finos. Por esta razón, el estudio de la neuroanatomía microscópica requiere tinciones histológicas específicas. Los investigadores han desarrollado muchas tinciones diferentes para identificar sustancias específicas en el interior o el exterior de las células. Para verificar la localización de una lesión cerebral se utilizará una de las más simples: la tinción de los somas celulares.

A finales del siglo pasado, Franz Nissl, un neurólogo alemán, descubrió que un tinte, llamado azul de metileno, podía teñir los somas celulares del tejido cerebral. El material que capta el tinte, conocido como *sustancia de Nissl*, está formado por ARN, ADN y proteínas asociadas localizadas en el núcleo y dispersas, en forma de gránulos, por el citoplasma. Además del azul de metileno se pueden utilizar muchos tintes para teñir los somas celulares, pero el que más se emplea es el violeta de cresilo. Por cierto, los tintes no se desarrollaron expresamente con fines histológicos sino que, en un principio, se fabricaron para teñir telas.

El descubrimiento de las tinciones de somas celulares hizo posible identificar masas nucleares en el encéfalo. En la figura 5.9 se representa una sección frontal de un encéfalo de gato teñida con violeta de cresilo. Repárese en que se pueden distinguir los fascículos de fibras porque tienen un aspecto más claro: no absorben el tinte (véase la ***figura 5.9***). La tinción no tiñe selectivamente los somas celulares neuronales; todas las células, ya sean neuronas o neurogliocitos, quedan teñidas por igual. Le corresponde al investigador determinar cuál es cuál —en función de su tamaño, forma y localización—.

Microscopía electrónica

El microscopio óptico tiene una escasa capacidad de resolución espacial para apreciar pequeños detalles. Debido a la naturaleza de la luz en sí misma, una amplificación de más de unas 1.500 veces no añade ningún detalle. Para poder ver estructuras anatómicas tan pequeñas como las vesículas sinápticas y detalles de los orgánulos celulares, los investigadores han de utilizar un microscopio electrónico. Con él se pasa un haz de electrones de un lado a otro del tejido a examinar. Una sombra del mismo se proyecta entonces sobre una placa fotográfica, la cual queda revelada por los electrones. Las micro

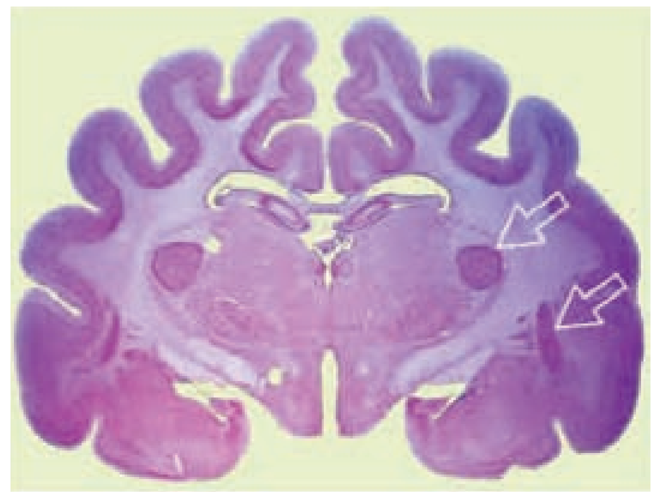


figura 5.9

Sección frontal del encéfalo de un gato, teñido con violeta de cresilo, una tinción del soma celular. Las puntas de flecha señalan los núcleos o grupos de somas celulares. (Material histológico por cortesía de Mary Carlson.)

fotografías electrónicas así producidas pueden aportar información sobre los detalles estructurales del orden de unas pocas decenas de nanómetros (véase la ***figura 5.10***).

Un **microscopio electrónico de barrido** proporciona un grado de amplificación (capacidad de aumento) menor que un microscopio electrónico de transmisión corriente, el cual transmite el haz de electrones a través del tejido. En cambio, muestra los objetos en tres dimensiones. El microscopio examina («barre») el tejido mediante un haz móvil de electrones. La información recibida por la reflexión del haz se utiliza para producir una imagen tridimensional muy detallada (véase la ***figura 5.11***).

Marcado de conexiones neurales

Supóngase que se está interesado en averiguar cuáles son los mecanismos neurales que controlan la conducta reproductora. Para empezar, se quisiera estudiar la fisiología de la conducta sexual de ratas hembra. A partir de algunas pistas obtenidas leyendo artículos de experimentos realizados por otros investigadores publicados en revistas científicas, se les practica la cirugía estereotáxica a dos grupos de ratas hembra. A las ratas del grupo experimental se les hace una lesión en el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), y a las ratas del grupo de referencia una lesión falsa. Después de unos cuantos días de recuperación, se acomoda (individualmente, por supuesto) a los animales con ratas macho. Las hembras del grupo de referencia respondieron positivamente a las atenciones de los machos: aceptaron la conducta de cortejo, a lo que siguió la copulación. Por el contrario, las hembras con lesiones en el HVM rechazaron las atenciones de los machos y rehuyeron la copulación. Mediante técnicas histológicas, se confirmó que, en efecto, el HVM del encéfalo de los animales de experimentación estaba destruido. (Un animal del grupo experimental copuló, pero más tarde se vio que en él la lesión no había afectado al HVM, de modo que se descartaron los datos de dicho sujeto).

Los resultados de este experimento indican que las neuronas del HVM parecen intervenir en las funciones requeridas para la conducta de cópula de las hembras. (Dicho sea de paso, resulta que estas lesiones no afectan a la conducta de apareamiento de los machos). Así que ¿adónde nos lleva esto? ¿Cuál es el siguiente paso? De hecho, se pueden seguir explorando muchos aspectos del tema. Uno de ellos concierne al sistema de estructuras cerebrales que participan en la conducta de apareamiento de las hembras. Evidentemente, el HVM no opera sólo, recibe aferencias de ciertas estructuras y envía eferencias a otras. La cópula requiere integrar percepciones visuales, táctiles y olfativas, y organizar los movimientos en respuesta a los de la pareja. Además, se necesita que todo el sistema sea



figura 5.10

Microfotografía electrónica de una sección a través de una sinapsis axodendrítica. Se señalan con flechas dos regiones sinápticas, y se destaca con un círculo una región de pinocitosis en un botón terminal adyacente, que posiblemente representa el reciclado de la membrana de la vesícula. T = botón terminal; f = microfilamentos; M = mitocondrias.

(De Rockel, A. J. y Jones, E. G. *Journal of Comparative Neurology*, 1973, *147*, 61-92).

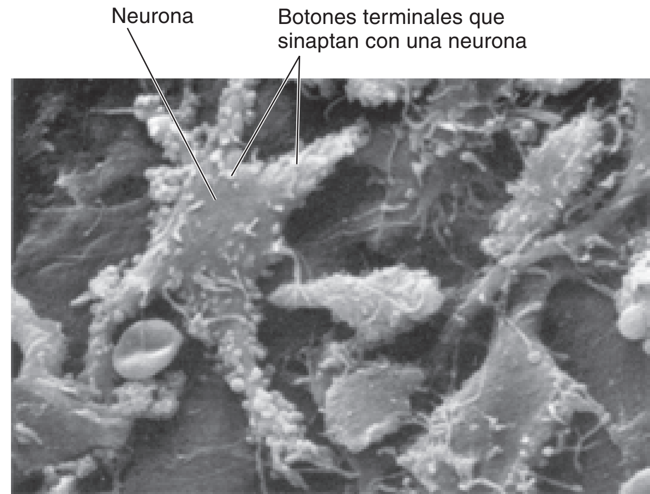


figura 5.11

Microfotografía electrónica de barrido de neuronas y neuroglia.

(De Kessel, R. G. y Kardon, R. H. *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*. San Francisco: W. H. Freeman, 1979. Reproducido con permiso).

microscopio electrónico de barrido Microscopio que aporta información tridimensional sobre la forma de la superficie de pequeños objetos.

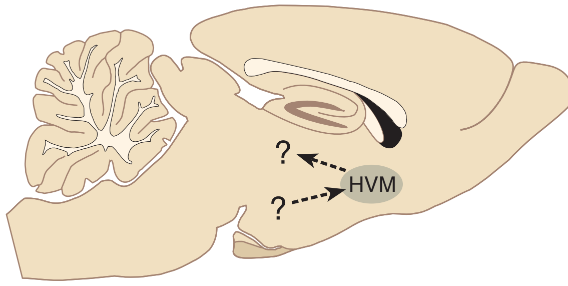


figura 5.12

Una vez que se sabe que una determinada región del encéfalo interviene en el control de una determinada función, cabe preguntarse cuáles son las estructuras que le aportan información y cuáles la reciben de ella.

activado por las hormonas sexuales adecuadas.¿Cuál es la función exacta del HVM en este complejo sistema?

Antes de pretender contestar a esta pregunta hay que saber más acerca de las conexiones del HVM con el resto del encéfalo. ¿Qué estructuras envían sus axones al HVM y a qué estructuras los envía éste a su vez? Una vez sabido cuáles son las conexiones, se podrá investigar la función de estas estructuras y el carácter de sus interacciones (véase la ***figura 5.12***).

¿Cómo se pueden investigar las conexiones del HVM? Esta cuestión no se puede resolver mediante procedimientos histológicos que tiñen todas las neuronas, como hace la tinción de los somas celulares. Si se observa detenidamente un encéfalo que ha sido preparado con tales métodos, únicamente se verá una masa enmarañada de neuronas. Pero en los últimos años los investigadores han desarrollado métodos de gran precisión que hacen resaltar a neuronas específicas de entre todas las demás.

Marcado de axones eferentes

En última instancia, el HVM tiene que afectar a la conducta. Es decir, las neuronas de este núcleo tienen que enviar axones a zonas del encéfalo en las que haya neuronas que medien los movimientos musculares. Probablemente la vía no sea directa; lo más seguro es que las neuronas del HVM afecten a neuronas localizadas en otras estructuras, las cuales a su vez influyan en las de otras estructuras, hasta que, finalmente, las neuronas motoras apropiadas sean estimuladas. Para poner de manifiesto este sistema se han de identificar las rutas que siguen los axones que salen del HVM. En otras palabras, se pretende ahora marcar los *axones eferentes* de dicha estructura.

Para marcar dichos axones se utilizará un **método de marcado anterógrado**. (*Anterógrado* significa «que se mueve hacia delante»). Estos métodos emplean sustancias que son captadas por las dendritas o los somas celulares y transportadas a lo largo del axón hasta los botones terminales.

A lo largo de los años, los neurocientíficos han desarrollado diferentes métodos para marcar las vías que siguen los axones eferentes. Un método ideado recientemente está desplazando a los anteriores, por lo que en este caso se utilizará éste. Los biólogos celulares han descubierto que una familia de proteínas producidas por plantas se unen a moléculas complejas específicas que existen en las células del sistema inmunitario. Se ha encontrado que estas proteínas, llamadas lecitinas, también pueden emplearse para trazar las vías neurales. Una lecitina determinada, la **PHA-L** (*phaseolus vulgaris leukoagglutinin*, si es que le interesa al lector saberlo), producida por la judía, es la que se emplea para identificar los axones eferentes.

Para descubrir el destino de los axones eferentes de las neuronas localizadas en el HVM, se inyecta en él una minúscula cantidad de PHA-L. (Para hacerlo se utilizará, obviamente, un aparato estereotáxico). Las moléculas de PHA-L son captadas por las dendritas y transportadas a través del soma al axón, por donde viajan mediante transporte axoplásmico rápido hasta los botones terminales. En pocos días las células están llenas de moléculas de PHA-L en su totalidad: las dendritas, el soma, el axón y todas sus ramificaciones, y los botones termínales. Entonces, se sacrifica al animal, se secciona el encéfalo y se acoplan las secciones sobre portaobjetos. Para poder ver las moléculas de PHA-L se aplica un método *inmunocitoquímico* especial, y las preparaciones se examinan al microscopio (véase la ***figura 5.13***).

Los **métodos inmunocitoquímicos** sacan provecho de las reacciones inmunitarias. El sistema inmunitario del organismo tiene la capacidad de producir anticuerpos en respuesta a los antígenos. Los *antígenos* son proteínas (o péptidos), como las que se encuentran en la superficie de las bacterias o los virus. Los *anticuerpos*, que también son proteínas, son producidos los leucocitos de la sangre para destruir a los microrganismos invasores. Los anticuerpos o bien son segregados por los leucocitos o bien se sitúan sobre su superficie, al igual que los receptores de los neurotransmisores se localizan sobre la membrana de las neuronas. Cuando los antígenos presentes en la superficie del microrganismo invasor entran en contacto con los anticuerpos que los reconocen, éstos desencadenan el ataque de los leucocitos sobre el invasor.

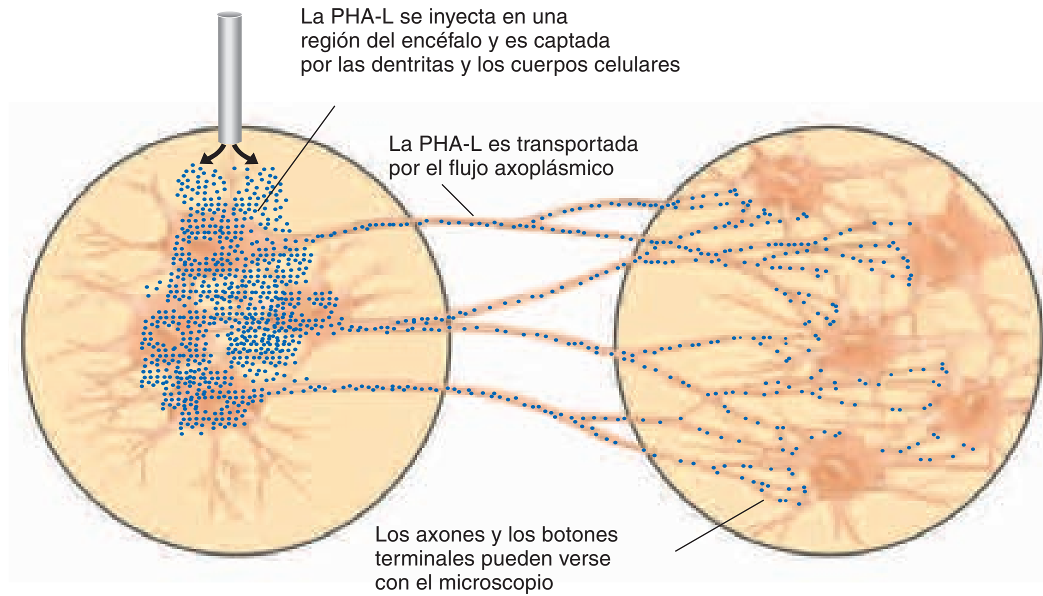
método de marcado anterógrado Método histológico que marca los axones y los botones terminales de neuronas cuyos somas celulares se localizan en una región determinada.

PHA-L *Phaseolus vulgaris leukoagglutinin*; proteína derivada de las judías, que se utiliza como marcador anterógrado; es captada por las dendritas y los somas celulares y transportada hasta los extremos de los axones.

método inmunocitoquímico Método histológico que emplea anticuerpos radioactivos o anticuerpos ligados a una molécula teñida para indicar la presencia de determinadas proteínas de péptidos.

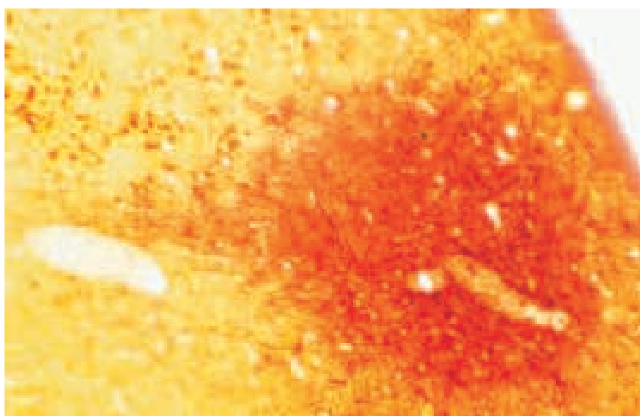
figura 5.13

Fundamento del uso de PHA-L para marcar los axones eferentes.

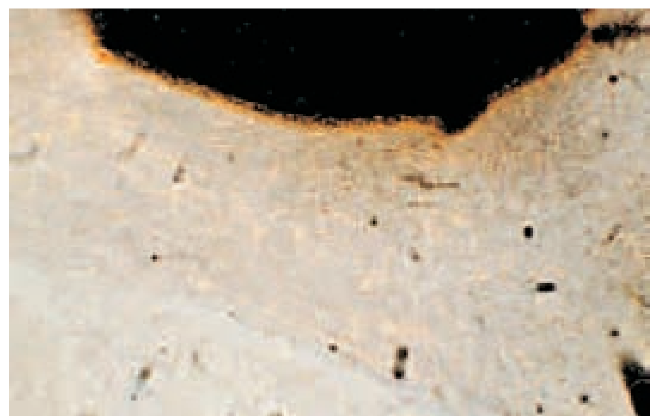


Los biólogos celulares han desarrollado métodos de producción de anticuerpos para cualquier péptido o proteína. Las moléculas de los anticuerpos están unidas a distintos tipos de moléculas de colorantes. Algunos de estos colorantes reaccionan con otras sustancias y tiñen el tejido de color marrón. Otros son fluorescentes: brillan cuando son expuestos a una luz de una determinada longitud de onda. Para determinar en qué parte del encéfalo se localiza el péptido o la proteína (el antígeno), los investigadores sumergen secciones frescas de tejido cerebral en una solución que contiene las moléculas de anticuerpo/colorante. Los anticuerpos se unen a su antígeno. Cuando el investigador examina las secciones con un microscopio (bajo una luz de una determinada longitud de onda, en el caso de tintes fluorescentes) puede ver cuáles son las partes del encéfalo —incluso qué neuronas individuales— contienen el antígeno.

La figura 5.14 muestra cómo se puede utilizar la PHA-L para identificar las eferencias de una región determinada del encéfalo. Se inyectaron moléculas de esta sustancia en el HVM. Dos días después, cuando la PHA-L había sido absorbida por las neuronas de esa región y transportada a los extremos de sus axones, se sacrificó al animal. Las secciones del encéfalo se trataron con un anticuerpo de la PHA-L, unido a un tinte que tiñe el tejido de color marrón rojizo. La figura 5.14(a) muestra el lugar de la inyección; como se puede ver, la lecitina llena los somas



(a)



(b)

figura 5.14

Método de marcado anterógrado. Se inyectó PHA-L en el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), donde fue captado por las dendritas y transportado a través de los axones de las células hasta los botones terminales. (a) Lugar de la inyección. (b) Axones y botones terminales de la sustancia gris periacueductal (SPG) marcados.
(Cortesía de Kirsten Nielsen Ricciardi y Jeffrey Blaustein, Universidad de Massachussets.)

celulares y las dendritas cercanas (véase la ***figura 5.14a***). La figura 5.14(b) presenta una microfotografía de la sustancia gris periacueductal (SGP). Esta región contiene algunos axones y botones terminales marcados (en dorado), lo cual demuestra que algunos axones eferentes del HVM terminan en la SGP (véase la ***figura 5.14b***).

Para seguir con el estudio de la función del HVM en la conducta sexual de las hembras habría que averiguar cuáles son las estructuras que reciben información de las neuronas del HVM (entre ellas, la SGP) y ver qué sucede cuando se lesiona cada una de ellas. Supóngase que el daño de algunas de estas estructuras altera también la conducta sexual femenina. Se inyectará PHA-L en dichas estructuras y se observará hacia dónde se dirigen sus axones. Finalmente, se descubrirá la vía principal que va desde el HVM hasta las neuronas motoras cuya actividad es necesaria para copular. (De hecho, los investigadores ya lo han hecho y algunos de los resultados obtenidos se expondrán en el capítulo 10).

Marcado de axones aferentes

Trazar los axones eferentes del HVM sólo explicará parte de la historia sobre los circuitos neurales implicados en la conducta sexual femenina: la parte que ocurre entre el HVM y las neuronas motoras. ¿Qué hay en cuanto a los circuitos que se sitúan antes del HVM? ¿Interviene de algún modo el HVM en el análisis de la información sensorial (como la visión, el olor o el toque del macho)? O tal vez los efectos activadores de las hormonas sexuales de la hembra sobre su conducta actúan a través del HVM, o de neuronas cuyos axones establecen sinapsis allí. Para descubrir cuáles son las regiones del encéfalo que están involucradas en los componentes «de la corriente superior» de los circuitos neurales, se ha de determinar cuáles son las aferencias que recibe el HVM —sus conexiones aferentes—. Para hacerlo, se empleará un **método de marcado retrógrado**.

Retrógrado significa «que se mueve hacia atrás». Los métodos de marcado retrógrado emplean sustancias que son captadas por los botones terminales y transportadas de vuelta a lo largo de los axones hacia los somas celulares. El método para identificar las aferencias que recibe una determinada región del encéfalo es similar al utilizado para identificar sus eferencias. En primer lugar, se inyecta en el HVM una pequeña cantidad de una sustancia denominada **oro fluorado**. La sustancia es absorbida por los botones terminales y transportada de vuelta a los somas celulares mediante transporte axoplásmico retrógrado. Pocos días después se sacrifica al animal, se secciona su encéfalo, y se examina el tejido bajo una luz de la longitud de onda adecuada. Las moléculas de oro fluorado emiten fluorescencia bajo esta luz. Se encontrará que la amígdala medial es una de las regiones que aportan aferencias al HVM (véase la ***figura 5.15).***

Los métodos de marcado anterógrado y retrógrado que se han descrito identifican un solo eslabón de una cadena de neuronas —neuronas cuyos axones entran o salen de una región cerebral determinada—. Los métodos de marcado *transneuronal* identifican una serie de dos, tres o más neuronas que forman conexiones sinápticas en serie una con otra. El método de marcado transneuronal más eficaz emplea un **virus de la seudorrabia** —una forma debilitada del virus herpes del cerdo que originalmente se concibió como vacuna—. El virus se inyecta directamente en una región cerebral, es captado por las neuronas del lugar y las infecta. El virus se extiende a través de las neuronas infectadas y finalmente es liberado, contagiando la infección a las neuronas con las que establece conexiones sinápticas. Algunas neuronas son destruidas por el virus; otras sobreviven a la infección. Este método puede utilizarse para marcar los circuitos, ya sea en dirección anterógrada o retrógrada.

Cuanto más espera el investigador tras inyectar el virus, mayor es la cantidad de neuronas que llegan a infectarse. Después de que el animal haya sido sacrificado y su encéfalo seccionado, se aplican métodos inmunocitoquímicos



figura 5.15

Método de marcado retrógrado. Se inyectó oro fluorado en el HVM, donde fue captado por los botones terminales y transportado de vuelta a través de los axones hasta sus somas celulares. La fotografía muestra estos somas celulares, localizados en la amígdala medial.
(Cortesía de Yvon Delville, *Medical School*, Massachusetts University.)

método de marcado retrógrado Método histológico que marca los somas celulares a los que pertenecen los botones terminales de los axones que establecen sinapsis con las células de una determinada región.

oro fluorado Tinción que sirve como marcador retrógrado; lo captan los botones terminales y lo transportan de vuelta a los somas celulares.

virus de la seudorrabia Forma debilitada de un virus herpes del cerdo; se usa como marcador transneuronal, el cual marca una serie de neuronas que están conectadas entre sí mediante sinapsis.

para localizar una proteína producida por el virus. Por ejemplo, Daniels, Miselis y Flanagan-Cato (1999) inyectaron el virus de la seudorrabia en los músculos que controlan la postura de apareamiento de las ratas hembra. Tras unos cuantos días, se sacrificó a las ratas y se buscaron en su encéfalo signos de infección vírica. El estudio indicó que el virus encontró su camino a lo largo de los nervios motores hasta las neuronas motoras de la médula espinal, de ahí a la formación reticular del bulbo, luego a la sustancia gris periacueductal y por último al HVM. Estos resultados confirman los de los métodos de marcado anterógrado y retrógrado que se acaban de describir. (También se encontraron neuronas infectadas en otras estructuras, pero ésto no es relevante en esta exposición).

Combinándolos, los métodos de marcado anterógrado y retrógrado —incluyendo los métodos transneuronales— permiten descubrir circuitos de neuronas interconectadas. Así, estos métodos contribuyen a obtener un «diagrama del cableado neural» del encéfalo (véase la ***figura 5.16***). Provistos de otros métodos de investigación (incluidos algunos de los que se describirán más adelante en este capítulo), se puede tratar de descubrir las funciones de cada uno de los componentes de dicho circuito.

Estudio del cerebro humano *in vivo*

Hay muy buenas razones para investigar las funciones del encéfalo de otros animales aparte de los seres humanos. Una de ellas es que se pueden comparar los resultados de estudios realizados con diferentes especies para sacar algunas conclusiones sobre la evolución de varios sistemas neurales. Aunque nuestro principal foco de interés sean las funciones del encéfalo humano, obviamente no se puede pedir a las personas que se sometan a cirugía cerebral con el fin de investigarlo. Pero, a veces, las enfermedades y los accidentes dañan el encéfalo humano, y si se sabe dónde se ha producido la lesión se puede estudiar la conducta de esas personas e intentar hacer el mismo tipo de inferencias que se hicieron respecto a las lesiones cerebrales producidas intencionadamente en los animales de laboratorio. El problema es ¿dónde se localiza la lesión?

En el pasado, un investigador podía estudiar la conducta de una persona con daño cerebral y no saber nunca con exactitud su localización. La única manera de asegurarse era conseguir el cerebro del paciente cuando moría y examinarlo al microscopio. Pero solía ser imposible. En ocasiones, el paciente sobrevivía al investigador. Había casos en que el paciente cambiaba de residencia. Algunas veces (quizá demasiadas), la familia no concedía la autorización para la autopsia. Debido a estos problemas prácticos, el estudio de los efectos comportamentales del daño en regiones específicas del encéfalo humano progresa más bien lentamente.

Los recientes avances en las técnicas de rayos X y en la tecnología de los ordenadores han llevado a concebir varios métodos para estudiar la anatomía del cerebro *in vivo*. Dichos avances permiten a los investigadores examinar la localización y extensión de la lesión cerebral mientras el paciente está aún vivo. El primer método que se ideó recibió el nombre de **tomografía axial computarizada (TAC)** (de los términos griegos *tomos*, «corte» y *graphein*, «escribir»). Este procedimiento, al que frecuentemente se le llama *imagen de TAC*, funciona como sigue: se coloca la cabeza del paciente en un amplio cilindro con forma ovalada. El cilindro contiene un aparato de rayos X y, justo enfrente de él (al otro lado de la cabeza del paciente), hay un detector de rayos X. El haz de rayos X pasa a través de la cabeza del paciente y el detector mide la cantidad de radioactividad que se transmite. Este haz explora la cabeza desde todos los ángulos, y un ordenador convierte los valores que recibe del detector en imágenes del cráneo y su contenido (véase la ***figura 5.17***).

En la figura 5.18 se presenta una serie de estas imágenes de TAC obtenidas de la cabeza de una paciente que había sufrido una apoplejía. Este accidente cerebrovascular dañó una parte del encéfalo implicada en la consciencia del propio cuerpo y en la percepción del espacio.

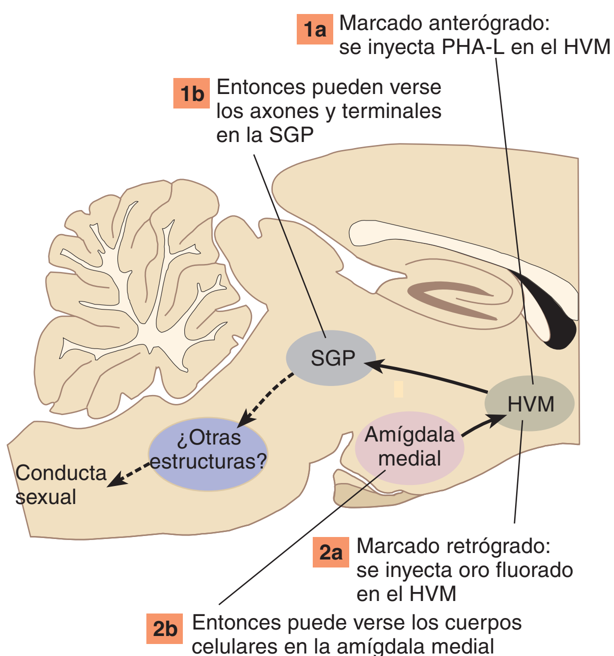


figura 5.16

Una de las aferencias al HVM y una de las eferencias, puestas de manifiesto por los métodos de marcado anterógrado y retrógrado.

tomografía axial computarizada (TAC) Instrumento que emplea un ordenador para analizar los datos obtenidos por un haz de rayos X, el cual efectúa un barrido para presentar una radiografía bidimensional de una «sección» a través del cuerpo.

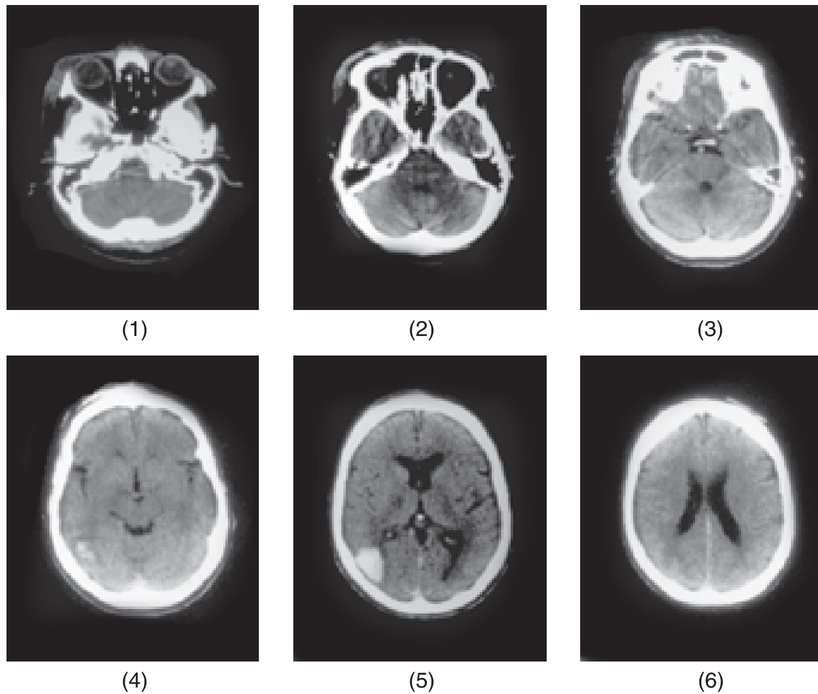


figura 5.18

Serie de TACs de un paciente con una lesión en el área occipito-parietal derecha (imagen 5). La lesión se ve en blanco debido a la hemorragia: la sangre absorbe más radiación que el tejido cerebral circundante. La zona rostral se sitúa arriba, la caudal abajo; los lados izquierdo y derecho están invertidos La imagen 1 muestra una sección a nivel de los ojos y la base del encéfalo.
(Cortesía de J. McA, Jones, *Good Samaritan Hospital*, Portland, Oregon.)

La paciente perdió la percepción consciente de la parte izquierda de su cuerpo y de los estímulos localizados a su izquierda. Se puede ver el daño como una mancha blanca en el lado inferior izquierdo de la imagen 5 (véase la ***figura 5.18***).

Una radiografía incluso más detallada de lo que hay en el interior de la cabeza de una persona la proporciona una técnica que se denomina **resonancia magnética (RM).** El equipo de RM se parece al del TAC, pero no utiliza rayos X. En lugar de ello, hace pasar un campo magnético extremadamente intenso a través de la cabeza del paciente. Cuando se coloca el cuerpo de un sujeto en un intenso campo magnético, los núcleos de algunos átomos de moléculas del organismo rotan siguiendo una determinada alineación. Si entonces se hace pasar una onda de radiofrecuencia a través del cuerpo, dichos núcleos emiten ondas de radio. Las diferentes moléculas emiten energía a diferentes frecuencias. El equipo de RM se ajusta para detectar la radiación procedente de los átomos de hidrógeno. Ya que la concentración de estos átomos en los distintos tejidos es diferente, el equipo puede utilizar la información para elaborar imágenes de secciones del encéfalo. A diferencia de las imágenes de TAC, que por lo general están limitadas a un plano horizontal, las de RM pueden obtenerse también en un plano sagital o uno frontal (véase la ***figura 5.19***).



figura 5.17

Tomografía axial computarizada (TAC).
(Larry Mulvihill/Rainbow.)

resumen intermedio

Ablación experimental

El objetivo de la investigación en Neurociencia comportamental es entender qué funciones cerebrales se requieren para llevar a cabo una conducta determinada y luego saber dónde se localizan los circuitos neurales que ejecutan esas

resonancia magnética Técnica por la cual puede obtenerse una imagen precisa del interior del organismo; implica la interacción entre ondas de radio y un fuerte campo magnético.

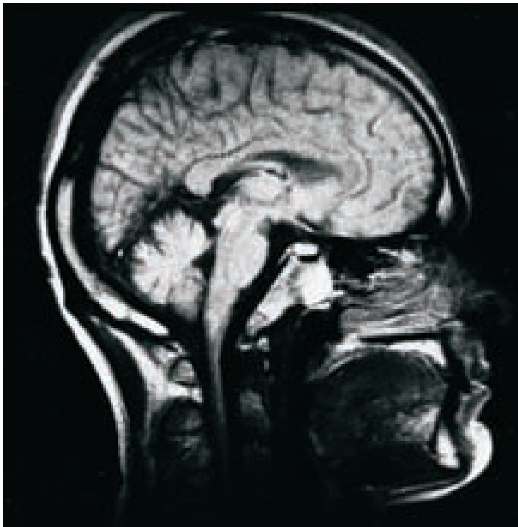


figura 5.19

RM sagital medial de un encéfalo humano.
(Foto por cortesía de *Philips Medical Systems*).

funciones. El método de lesión es el más antiguo de los que se emplean en este tipo de investigación y sigue siendo uno de los más útiles. Una lesión subcortical se efectúa con la ayuda de un aparato estereotáxico. Se obtienen las coordenadas en un atlas estereotáxico, y luego se sitúa la punta del electrodo o de la cánula en la sede del objetivo. Se realiza una lesión haciendo pasar corriente de RF a través del electrodo o infundiendo un aminoácido excitatorio a través de la cánula, produciendo así una lesión excitotóxica. La ventaja de estas lesiones es que sólo destruyen los somas celulares de las neuronas; los axones que atraviesan la región no resultan dañados.

Se ha de determinar la localización de la lesión tras haber observado la conducta del animal. El animal se sacrifica de forma humanitaria, se perfusiona el encéfalo con una solución salina, se extrae del cráneo y se conserva en un fijador como la formalina. Se utiliza un microtomo para seccionar el tejido, el cual generalmente se ha congelado con el fin de endurecerlo suficientemente para poder cortarlo en finas secciones. Estas se montan en portaobjetos, teñidas con un colorante de somas celulares, y se examinan al microscopio.

El microscopio óptico permite ver las células y sus orgánulos más grandes, pero para ver los pequeños pormenores, tales como cada una de las mitocondrias o las vesículas sinápticas, se necesita un microscopio electrónico. El microscopio electrónico de barrido proporciona una vista tridimensional del tejido, pero con amplificación menor que el microscopio electrónico de transmisión convencional.

El siguiente paso en un programa de investigación a menudo requiere que el investigador descubra las conexiones aferentes y eferentes de la región que se está estudiando con el resto del encéfalo. Las conexiones eferentes (las que transmiten información de la región en cuestión a otras partes del encéfalo) son puestas de manifiesto con métodos de marcado anterógrado, como el que utiliza PHA-L. Las conexiones aferentes (aquellas que llevan información a la región en cuestión desde otras partes del encéfalo) se evidencian con métodos de marcado retrógrado, como el que usa oro fluorado. Las cadenas de neuronas que establecen conexiones sinápticas pueden verse con métodos de marcado transneuronal, los cuales emplean el virus de la seudorrabia.

Aunque no se realizan lesiones deliberadas en el encéfalo de los seres humanos con fines de investigación, las enfermedades y los accidentes pueden causar una lesión cerebral y, si se sabe dónde se localiza dicha lesión, se puede estudiar la conducta de los sujetos y sacar conclusiones acerca de la localización de los circuitos neurales que llevan a cabo funciones importantes. Si el paciente muere y puede disponerse de su encéfalo para examinarlo, se pueden aplicar los métodos histológicos habituales. En otro caso, se puede examinar el cerebro *in vivo* utilizando exploraciones con TAC o con RM.

En la ***tabla 5.1*** se resumen los métodos de investigación descritos en este apartado.

Registro y estimulación de la actividad neural

La primera parte de este capítulo se ocupó de la anatomía del encéfalo y los efectos de las lesiones en determinadas regiones cerebrales. Esta sección aborda una aproximación diferente: el estudio del encéfalo mediante el registro o la estimulación de la actividad de regiones específicas. Las funciones cerebrales implican la actividad de circuitos neuronales; así, las diferentes percepciones y respuestas comportamentales implican diferentes patrones de actividad cerebral. Los investigadores han elaborado métodos para registrar estos patrones o para producirlos de forma artificial.

Registro de la actividad neural

Los axones producen potenciales de acción, y los botones terminales provocan potenciales postsinápticos en la membrana de las células con las que establecen sinapsis. Estos fenómenos eléctricos pueden registrarse (como se vio en el capítulo 2), y los cambios en la actividad eléctrica de una región concreta se pueden utilizar para determinar si dicha región participa en el control de diversas conductas. Por ejemplo, pueden hacerse registros durante la presentación de un estímulo, el proceso de toma de decisiones o la ejecución de una actividad motora.

tabla 5.1

Métodos de investigación: Parte I		
OBJETIVO DEL MÉTODO	**MÉTODO**	**OBSERVACIONES**
Destruir o inactivar regiones cerebrales específicas	Lesión por radiofrecuencia	Destruye todo el tejido cerebral próximo a la punta del electrodo
	Lesiones excitotóxicas; utiliza aminoácidos excitatorios como el ácido caínico	Destruye sólo los somas celulares próximos al extremo de la cánula; no afecta a los axones que atraviesan la región
	Lesión con 6-HD	Destruye las neuronas catecolaminérgicas próximas al extremo de la cánula
	Infusión de un anestésico local; criodo	Inactiva temporalmente regiones cerebrales específicas; el animal puede servir como su propio testigo
Situar electrodos o cánulas en una región intracerebral específica	Cirugía estereotáxica	Consultar un atlas estereotáxico para determinar las coordenadas
Encontrar la sede de la lesión	Perfusión del encéfalo, fijación, sección y tinción de las secciones	
Identificar los axones eferentes de una región determinada y los botones terminales de dichos axones	Método de marcado anterógrado, como el de PHA-L	
Identificar la localización de neuronas cuyos axones terminan en una región determinada	Método de marcado retrógrado, como el oro fluorado	
Identificar series de neuronas que están conectadas sinápticamente	Método de marcado transneuronal; utiliza el virus de la seudorrabia	Puede utilizarse tanto para el marcado anterógrado como para el retrógrado
Identificar la localización de la lesión en el encéfalo humano vivo	Tomografía computarizada (TAC)	Muestra secciones del encéfalo; utiliza rayos X
	Resonancia magnética (RM)	Muestra secciones del encéfalo; mejor resolución espacial que la TAC; utiliza un campo magnético y ondas de radio

Los registros pueden realizarse *crónicamente*, durante un largo período de tiempo después de que el animal se haya recuperado de la intervención quirúrgica; o de forma *aguda*, durante un período de tiempo relativamente corto durante el cual el animal permanece anestesiado. Los registros agudos, efectuados bajo anestesia, por lo general se limitan al estudio de las vías sensoriales. Dichos registros rara vez se acompañan de observaciones comportamentales, ya que la capacidad comportamental de un animal anestesiado es, cuando menos, limitada.

Registro con microelectrodos

Los agentes químicos que afectan a las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas también afectan al sueño REM. Supóngase que, sabiendo esto, uno se plantea si la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas variaría durante las diferentes fases del sueño. Para averiguarlo, se registraría la actividad de dichas neuronas con microelectrodos. Los **microelectrodos** tienen una punta muy fina, lo suficientemente pequeña para poder registrar la actividad eléctrica de neuronas individuales. Esta técnica se denomina generalmente **registro de neuronas individuales** (o de unidades).

Los microelectrodos se pueden fabricar con tubos de vidrio muy finos. Como se vio en el capítulo 2, estos electrodos pueden utilizarse para registrar los potenciales de acción en el axón gigante del calamar. Los electrodos de vidrio tienen una propiedad interesante. Si se calientan hasta ablandarlos y se estiran sus extremos hasta que se separan, el vidrio reblandecido se alarga y se consigue un filamento muy fino. Sin embargo, independientemente de

microelectrodo Electrodo muy fino, generalmente se utiliza para registrar la actividad de neuronas individuales.

registro de neuronas individuales Registro de la actividad eléctrica de una sola neurona.

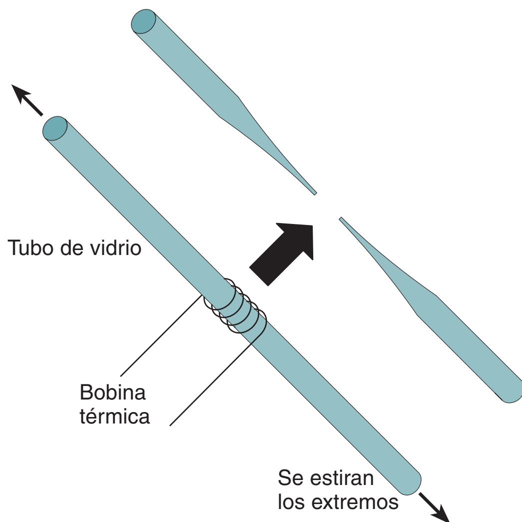


figura 5.20

Microelectrodos fabricados calentando la parte central de un tubo capilar alargado de vidrio y estirando los extremos.

lo fino que llegue a ser, sigue teniendo un orificio que lo recorre de un extremo al otro. Para construir un microelectrodo de vidrio, se calienta la zona media de un tubo capilar (vidrio de un diámetro externo de aproximadamente 1 mm) y luego se estiran con fuerza sus extremos. El tubo de vidrio se va haciendo cada vez más delgado, hasta que se quiebra. El resultado son dos microelectrodos, que se representan en la ***figura 5.20.*** (Éstos se obtienen generalmente con la ayuda de un aparato especial, llamado *tirador de microelectrodos*). El vidrio no conduce corriente eléctrica, por lo que el microelectrodo se rellena de un líquido conductor, como una solución de cloruro de potasio.

Puesto que se quiere registrar la actividad de neuronas individuales durante un largo período de tiempo en animales no anestesiados, se elegirán electrodos que duren más. Se puede conseguir un juego de cables muy finos, unidos en un manojo. Los cables se aíslan con un barniz especial de modo que sólo sus puntas queden sin recubrir. Los cables son lo suficientemente flexibles para poder seguir los movimientos del tejido cerebral causados por los movimientos de la cabeza del animal. En consecuencia, se reduce la probabilidad de dañar a las neuronas cuya señal se está registrando. Por otra parte, se puede registrar la actividad de varias neuronas individuales de una región concreta del encéfalo.

Los electrodos se implantan en el encéfalo de los animales mediante cirugía estereotáxica. Luego se conectan a unos zócalos de conexión eléctrica en miniatura y éstos se fijan al cráneo del animal con una pasta que en un principio se ideó para uso de los dentistas (cemento dental). Luego, cuando el animal se ha recuperado de la cirugía, ya se le puede «conectar» al sistema de registro. Los animales de laboratorio no prestan atención a los zócalos de conexión eléctrica que tienen sobre la cabeza y se comportan con bastante normalidad (véase la ***figura 5.21***).

En muchas ocasiones, los investigadores fijan dispositivos bastante complejos al cráneo del animal cuando implantan microelectrodos. Estos dispositivos incluyen mecanismos de tornillos que permiten al experimentador desplazar el electrodo —o el conjunto de electrodos— al interior del encéfalo, de forma que pueda registrar diferentes partes del encéfalo mientras realiza sus observaciones.

Las señales eléctricas que detectan los microelectrodos son bastante débiles y tienen que amplificarse. Los amplificadores utilizados con tal fin funcionan de la misma manera que los de un equipo estéreo, convirtiendo las débiles señales registradas en el encéfalo en otras más fuertes. Estas señales pueden verse en un osciloscopio y almacenarse en la memoria de un ordenador para analizarlas más tarde.

¿Cuáles son los resultados de este registro de neuronas serotoninérgicas y adrenérgicas? Como se estudiará en el capítulo 9, si se registra la actividad de neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas durante diferentes fases del sueño se encontrará que la frecuencia de descarga de estas neuronas decae casi hasta cero durante el sueño REM. Esta observación sugiere que dichas neuronas tienen un efecto *inhibitorio* sobre este tipo de sueño. Es decir, el sueño REM no puede ocurrir hasta que estas neuronas dejan de descargar.

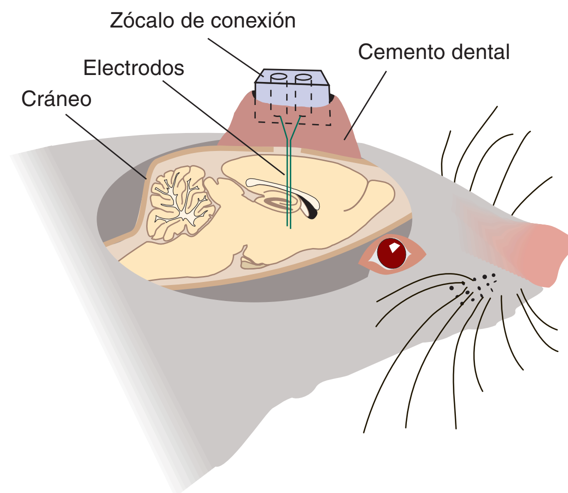


figura 5.21

Grupo de electrodos unidos permanentemente al cráneo mediante una base de cemento.

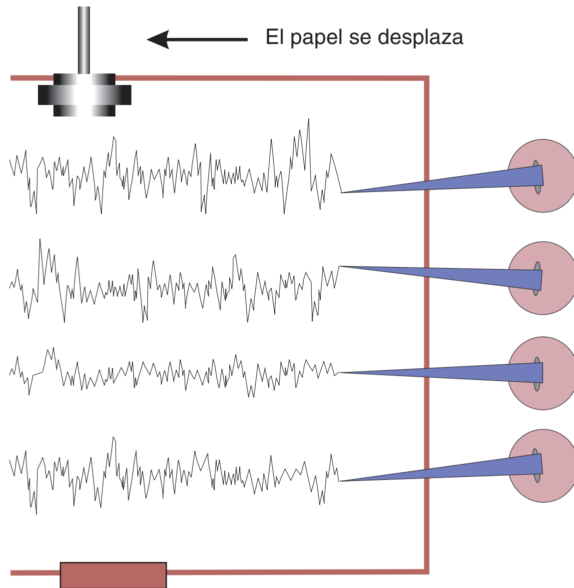


figura 5.22

Registro obtenido mediante un oscilógrafo de tinta (polígrafo).

Registro con macroelectrodos

A veces se quiere registrar la actividad de una región global del encéfalo, no la actividad de las neuronas individuales que se localizan en ella. Para hacerlo se utilizarían macroelectrodos. Los **macroelectrodos** no detectan la actividad de neuronas individuales; antes bien, los registros que se obtienen mediante tales dispositivos representan los potenciales postsinápticos de muchos miles —o millones— de células del área en que se sitúa el electrodo. Estos electrodos pueden consistir en alambres no afilados insertados en el encéfalo, tornillos fijados sobre el cráneo o incluso discos de metal pegados sobre el cuero cabelludo de sujetos humanos con una pasta especial que conduce la electricidad. Los registros, en particular los tomados del cuero cabelludo, representan la actividad de una gran cantidad de neuronas, cuyas señales eléctricas atraviesan las meninges, el cráneo y el cuero cabelludo antes de alcanzar los electrodos.

En algunas ocasiones, los neurocirujanos implantan macroelectrodos directamente en el interior del encéfalo humano. La razón de hacerlo es detectar el origen de una actividad eléctrica anómala que origina frecuentes convulsiones. Una vez detectada la fuente, el cirujano puede abrir el cráneo y extraer el foco de las convulsiones —habitualmente, tejido cicatricial producido por un daño cerebral ocurrido años antes—. Más frecuentemente, la actividad eléctrica del encéfalo humano se registra mediante electrodos pegados al cuero cabelludo, y se puede observar en un *oscilógrafo de tinta*, comúnmente denominado *polígrafo*.

Un polígrafo contiene un mecanismo que hace avanzar una larga tira de papel sobre la que escriben una serie de plumillas. Éstas básicamente son manecillas de grandes voltímetros, que se mueven hacia arriba y abajo en respuesta a la señal eléctrica que les envían los amplificadores biológicos. En la figura 5.22 se representa un registro de la actividad eléctrica obtenido mediante macroelectrodos situados en varios lugares del cuero cabelludo de un individuo (véase la ***figura 5.22***). Dichos registros se llaman **electroencefalogramas** (**EEGs**), o «escritos de la electricidad de la cabeza». Pueden utilizarse para el diagnóstico de la epilepsia o de tumores cerebrales, o para estudiar las fases de sueño y vigilia, las cuales se asocian a patrones de actividad eléctrica característicos.

Otra aplicación del EEG es supervisar el estado del encéfalo durante intervenciones que, en principio, pueden dañarlo. El autor presenció una de estas intervenciones hace varios años.

La Sra. F. sufrió un ataque cardíaco moderado y las pruebas posteriores indicaron que padecía una considerable ateroesclerosis, generalmente denominada «endurecimiento de las arterias». Muchas de sus arterias se habían estrechado debido a placas ateroescleróticas ricas en colesterol. Un trombo, formado en una parte especialmente estrecha de una de sus arterias coronarias, fue lo que provocó el ataque. Tras su primer ataque, su médico le prescribió un fármaco que reducía la tendencia de sus trombocitos (plaquetas sanguíneas) a formar coágulos.

Sabiendo que la ateroesclerosis no se limita a las arterias del corazón, el médico utilizó el fonendoscopio para auscultarle las arterias carótidas y, con bastante claridad, escuchó —especialmente en el lado izquierdo— los característicos ruidos (el término procede de la palabra francesa *bruits*) que se producían cuando la sangre pasaba por sus estrechos y endurecidos vasos sanguíneos. Meses después de su ataque al corazón, la Sra. F. tuvo varios *ataques isquémicos transitorios*, breves episodios de síntomas neurológicos que parecen deberse a trombos que se forman y luego se disuelven en los vasos sanguíneos cerebrales. En su caso, le provocaron entumecimiento en el brazo derecho y dificultades para hablar. Su médico la refirió a un neurólogo, quien le mandó hacerse un angiograma. Este reveló que su arteria carótida izquierda estaba casi totalmente obstruida. El neurólogo recomendó a la Sra. F. que consultara al neurocirujano, y éste la urgió a someterse a una intervención quirúrgica en la que se extraería la placa que

macroelectrodo Electrodo que se usa para registrar la actividad eléctrica de una gran cantidad de neuronas en una región determinada del encéfalo; mucho más grande que un microelectrodo.

electroencefalograma (EEG) Potencial eléctrico cerebral registrado mediante electrodos situados en el cuero cabelludo.

estaba obstruyendo parte de su arteria carótida izquierda, con lo que aumentaría el aporte sanguíneo al lado izquierdo del encéfalo.

El procedimiento se denomina *endoarteriectomía carótida*. Yo estaba conversando con el neurocirujano de la Sra. F. después de una conferencia y casualmente comentó que iba a realizar la operación más tarde esa mañana. Le pregunté si podía asistir y dio su consentimiento. Cuando entré en la sala de operaciones, con vestimentas esterilizadas,. encontré a la Sra. F. ya anestesiada, y la enfermera había preparado el lado izquierdo de su cuello para la incisión. Además, se le habían colocado varios electrodos de EEG en el cuero cabelludo y vi al Dr. L., un neurólogo especializado en Neurofisiología clínica, sentado ante su aparato de EEG.

El cirujano hizo una incisión en el cuello de la Sra. F. y dejó al descubierto su carótida interna en el punto donde la carótida común, que procede del corazón, se divide en la carótida interna y la externa. Colocó una cinta de plástico alrededor de la arteria carótida común, pinzándola y deteniendo el flujo de sangre. «¿Qué aspecto tiene, Ken?» le preguntó al Dr. L. «No muy bueno; veo cierta lentificación. Deberías hacer una derivación».

El cirujano quitó rápidamente la banda compresora y le pidió a la enfermera una sonda de derivación, un corto tubo de plástico un poco más fino que la arteria. Hizo dos pequeñas incisiones en la arteria bastante por encima y por debajo de la región en donde estaba la placa, e insertó la sonda. Ahora ya podía trabajar en la arteria sin detener el flujo de sangre al cerebro. Hizo un corte longitudinal en la arteria, que dejo ver una masa amarillenta que seccionó y extirpó. Cerró la incisión, extrajo la sonda y suturó los pequeños cortes que había hecho para colocarla. «¿Va todo bien?» preguntó al Dr. L. «Sí, su EEG está bien».

La mayoría de los neurocirujanos prefieren hacer una endoarteriectomía pinzando temporalmente la arteria ocluída mientras trabajan en ella. El trabajo es más rápido, y las complicaciones son menos probables. Dado que hay una conexión del aporte sanguíneo a cada uno de los hemisferios del encéfalo (mediante *arterias comunicantes* especiales), a menudo es posible sellar una de las arterias carótidas durante unos minutos sin provocar ningún daño. Sin embargo, a veces el flujo sanguíneo de un lado del encéfalo al otro no es suficiente para mantener a uno de los lados abastecido de sangre y oxígeno. El único modo que tiene el cirujano de saberlo es poder disponer del EEG del paciente. Si el cerebro no está recibiendo el aporte sanguíneo necesario, en el EEG se verán las características «ondas lentas». Esto es lo que sucedió al pinzar la arteria de la Sra. F y es por lo que el cirujano tuvo que usar una sonda de derivación. Sin ello, la intervención podría haber causado una apoplejía en lugar de prevenirla.

Por cierto, la Sra. F. se recuperó bien de la intervención.

magnetoencefalografía Procedimiento que detecta la actividad de grupos de neuronas que descargan sincronizadamente, gracias al campo magnético inducido por actividad eléctrica de éstas; emplea un conjunto de dispositivos superconductores de interferencias cuánticas o *SQUIDs*.

Magnetoencefalografía

Como si duda el lector ya sabe, cuando una corriente eléctrica fluye a través de un conductor, induce un campo magnético. Esto significa que cuando los potenciales de acción se transmiten a lo largo de los axones o los potenciales postsinápticos se transmiten por las dendritas o se propagan de un lado a otro de la membrana somática de una neurona, también se producen campos magnéticos. Estos campos son sumamente pequeños, pero los ingenieros han elaborado detectores superconductores (llamados SQUIDs, o «dispositivos superconductores de interferencias cuánticas») capaces de detectar campos magnéticos que son de aproximadamente una mil millonésima parte del tamaño del campo magnético de la tierra. La **magnetoencefalografía** se realiza mediante *neuromagnetómetros*, instrumentos que contienen una matriz de varios SQUIDs, dispuestos de manera que un ordenador pueda examinar su emisión y calcular el origen de señales determinadas en el encéfalo. El neuromagnetómetro que se muestra en la figura 5.23 contiene 275 SQUIDs. Estos aparatos pueden utilizarse en la práctica clínica, por ejemplo, para localizar el foco de crisis



figura 5.23

Magnetoelectroencefalografía. El neuromagnetómetro se muestra a la izquierda del monitor. En la parte derecha de la pantalla pueden verse las regiones con elevada actividad eléctrica, superpuestas a una imagen del encéfalo obtenida con RM.
(Cortesía de CTF *Systems Inc.*)

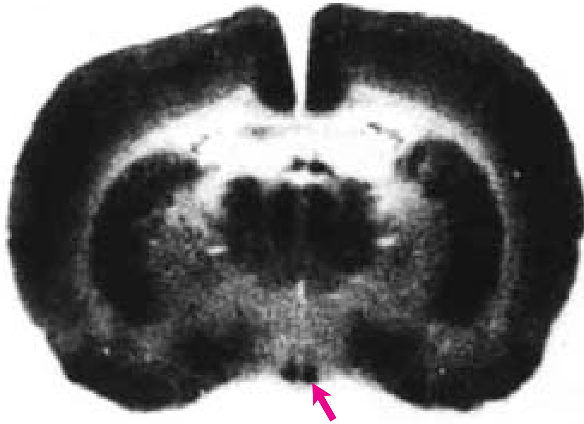


figura 5.24

Autorradiografía con 2-DG del encéfalo de una rata (sección frontal, la zona dorsal se sitúa arriba), en la que se ven regiones con una actividad marcadamente elevada en el par de núcleos hipotalámicos, en la base del encéfalo.
(De Schwartz, W. J. y Gainer, H. *Science*, 1977, *197*, 1089-1091.)

epilépticas y así poder extirparlas quirúrgicamente. También pueden usarse en experimentos para medir la actividad cerebral regional asociada a la percepción de diversos estímulos o la ejecución de varias conductas o tareas cognitivas (véase la ***figura 5.23***).

Registro de la actividad metabólica y sináptica del cerebro

Las señales eléctricas no son los únicos signos de actividad neural. Si la actividad neural de una región concreta del encéfalo aumenta, el índice metabólico también lo hace, en gran medida como consecuencia del mayor funcionamiento de las bombas iónicas de la membrana de las células. Este aumento del índice metabólico puede medirse. El investigador inyecta **2-desoxiglucosa (2-DG)** radiactiva en el torrente circulatorio del animal. Dado que esta sustancia es similar a la glucosa (la principal fuente de energía del encéfalo), es transportada al interior de las células. Así, las células más activas, que son las que consumen más glucosa, llegan a ser las que alcanzan la mayor concentración de 2-DG radioactiva. Pero, a diferencia de la glucosa normal, la 2-DG no puede ser metabolizada, de modo que queda dentro de la célula. Luego, el investigador sacrifica al animal, extrae su encéfalo, lo secciona y lo prepara para la *autorradiografía*.

Autorradiografía podría traducirse aproximadamente como «escribir con la propia radiación». Sobre un portaobjetos se monta una sección del encéfalo. Se lleva entonces a una habitación oscura, donde se cubre con una emulsión fotográfica (la sustancia que tienen las películas fotográficas). Varias semanas después, la sección, con su capa de emulsión, se revela exactamente igual que una película fotográfica. Las moléculas de 2-DG radioactiva se ponen de manifiesto como puntos de gránulos plateados en la emulsión revelada, ya que la radioactividad revela la emulsión, tal como lo harían los rayos X o la luz.

Las zonas más activas del encéfalo contienen el mayor grado de radioactividad; ésta se manifiesta en la emulsión revelada como puntos oscuros. En la figura 5.24 se muestra una autorradiografía de una sección del encéfalo de rata; los puntos oscuros en la parte inferior (señalados con la flecha) son núcleos del hipotálamo que tienen un índice metabólico especialmente elevado. En el capítulo 9 se describen dichos núcleos y sus funciones (véase la ***figura 5.24***).

Otro método para identificar las regiones activas del encéfalo saca provecho de que cuando las neuronas son estimuladas (por ejemplo, por los botones terminales que establecen sinapsis con ellas), determinados genes del núcleo, a los que se les llama *genes de expresión temprana*, son activados y se producen proteínas específicas. Estas proteínas se unen entonces a los cromosomas del núcleo. La presencia de estas proteínas nucleares indica que las neuronas acaban de ser activadas.

Una de estas proteínas nucleares producida durante la activación neural recibe el nombre de **Fos**. Como se recordará, antes se estaba explicando una supuesta investigación acerca de los circuitos neurales implicados en la conducta sexual de la rata hembra. Supóngase que se quiere utilizar el método Fos en ese proyecto de investigación para ver qué neuronas se activan durante la actividad sexual de una rata hembra. Se instalan ratas hembra con machos y se les permite aparearse. Luego se extrae el encéfalo de las ratas, se secciona y se sigue un procedimiento para teñir la proteína Fos. En la figura 5.25 se presentan los resultados: en las neuronas de la amígdala medial de una rata hembra que acaba de aparearse pueden observarse puntos oscuros, lo que indica la presencia de proteína Fos. Así, parece ser que estas neuronas se han activado debido a la cópula —quizá por la estimulación física de los genitales que han tenido las ratas—. Como se recordará, cuando se inyectó un marcador retrógrado (oro fluorado) en el HVM, se encontró que esta

2-desoxiglucosa (2-D) Azúcar que penetra en las células junto con la glucosa pero que no se metaboliza.

autorradiografía Procedimiento que localiza sustancias radioactivas en una sección de tejido; la radiación revela una emulsión fotográfica o un fragmento de película que recubre el tejido.

Fos Proteína producida en el núcleo de una neurona en respuesta a la estimulación sináptica.

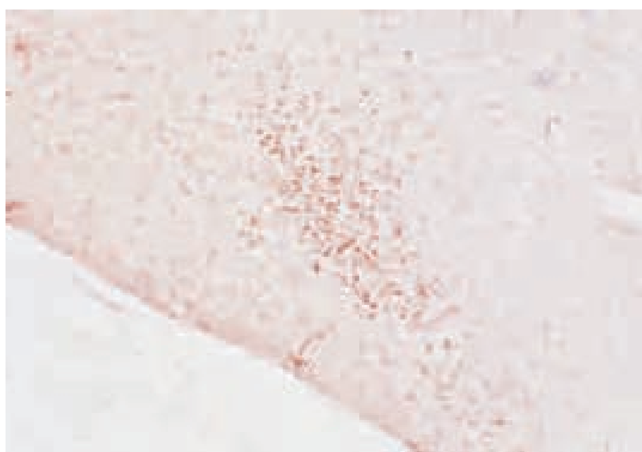


figura 5.25

Localización de la proteína Fos. La microfotografía muestra una sección frontal del encéfalo de una rata hembra, obtenida en un plano transversal de la amígdala medial. Los puntos oscuros indican la presencia de proteína Fos, localizada mediante inmunocitoquímica. La síntesis de proteína Fos se estimuló permitiendo al animal tener una conducta de apareamiento.
(Cortesía de Marc Tetel, *Skidmore College*.)

región recibe aferencias de la amígdala medial (véase la ***figura 5.25***).

La actividad metabólica de regiones cerebrales específicas puede asimismo medirse en el encéfalo humano utilizando un método conocido como **tomografía por emisión de positrones (TEP)**. En primer lugar, al paciente se le inyecta 2-DG radioactiva. (Finalmente, la sustancia se degrada y sale de las células. La dosis que se administra a los pacientes humanos es inocua). La cabeza del sujeto se coloca en un aparato similar al de un TAC. Cuando las moléculas radiactivas de 2-DG se descomponen, emiten partículas subatómicas llamadas positrones, que son detectadas por el equipo de TEP. El ordenador determina cuáles son las regiones del encéfalo que han absorbido la sustancia radioactiva y crea una imagen de una sección del encéfalo, mostrando el nivel de actividad de las diferentes regiones de dicha sección (véase la ***figura 5.26***).

tomografía por emisión de positrones (TEP) Aplicación de un instrumento que deja ver la localización de un marcador radioactivo en un encéfalo vivo.

resonancia magnética funcional (RMf) Innovación del procedimiento de la RM, que permite medir el metabolismo regional en el encéfalo.

Uno de los inconvenientes de la TEP es su coste de funcionamiento. Por motivos de seguridad, las sustancias radioactivas que se administran tienen una vida media muy corta; es decir, se descomponen y pierden su radioactividad muy rápidamente. Por ejemplo, la vida media de la 2-DG radioactiva es de 110 minutos; la del agua radioactiva (que también se utiliza para obtener imágenes de TEP) es de sólo 2 minutos. Teniendo en cuenta que estas sustancias se descomponen tan deprisa, tienen que ser producidas en el lugar donde se van a utilizar, mediante un acelerador de partículas atómicas denominado ciclotrón. Por lo tanto, al coste de la TEP hay que añadirle el del *ciclotrón* y los salarios del personal que trabajan en ellos.

El desarrollo más reciente en neuroimagen cerebral es la **resonancia magnética funcional (RMf)**. Los ingenieros han diseñado modificaciones de la RM ya existente que

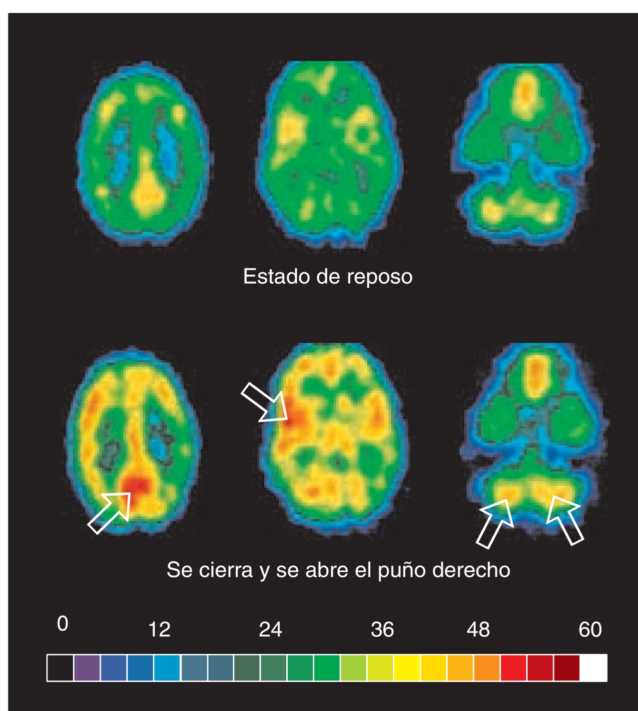


figura 5.26

Imágenes de TEP de un encéfalo humano (secciones horizontales). La fila superior muestra tres imágenes de una persona en estado de reposo. La fila inferior muestra tres imágenes de la misma persona mientras abría y cerraba el puño derecho. En las imágenes se observa un aumento de la captación de 2-desoxiglucosa radioactiva en las regiones del cerebro encargadas del control del movimiento, lo que indica un aumento del índice metabólico en dichas áreas. Los diferentes colores que genera el ordenador indican diferentes índices de captación de 2-DG, conforme representa la escala en la parte inferior.
(Cortesía del *Brookhaven National Laboratory y la State University* de Nueva York, Stony Brook.)

consiguen imágenes con gran rapidez y permiten medir el metabolismo regional, detectando los niveles de oxígeno en los vasos sanguíneos del encéfalo. Las imágenes de RM funcional tienen mayor resolución que las de TEP y pueden obtenerse mucho más rápidamente. Por lo tanto, dejan ver una información más detallada sobre la actividad de regiones cerebrales específicas (véase la ***figura 5.27***).

Medida de las secreciones cerebrales

A veces se está interesado, no en la actividad metabólica general de determinadas regiones del encéfalo, sino en la secreción de neurotransmisores o neuromoduladores específicos en esas regiones. Por ejemplo, supóngase que se sabe que las neuronas colinérgicas del tronco del encéfalo participan en el control del sueño REM. (Los experimentos que aportaron este dato se describen en la sección siguiente de este capítulo). Una de las características del sueño REM es la atonía muscular, la cual impide que nos levantemos de la cama y representemos nuestros ensueños. Se decide medir la secreción de acetilcolina en una región del bulbo, en la que se sabe que hay neuronas secretoras de glicina que inhiben a las motoneuronas de la médula espinal. Para hacer esto se utiliza un procedimiento denominado **microdiálisis**.

La *diálisis* es un proceso mediante el cual se separan sustancias utilizando una membrana artificial permeable a algunas moléculas, pero no a otras. Una sonda de microdiálisis consiste en un pequeño tubo de metal que introduce una solución en una sección de un tubo de diálisis —un trozo de membrana artificial moldeada en forma de cilindro, sellada en el extremo inferior—. Otro pequeño tubo de metal extrae la solución después de que ésta haya circulado por el tubo de diálisis. En la ***figura 5.28*** se muestra un esquema de este tipo de sonda.

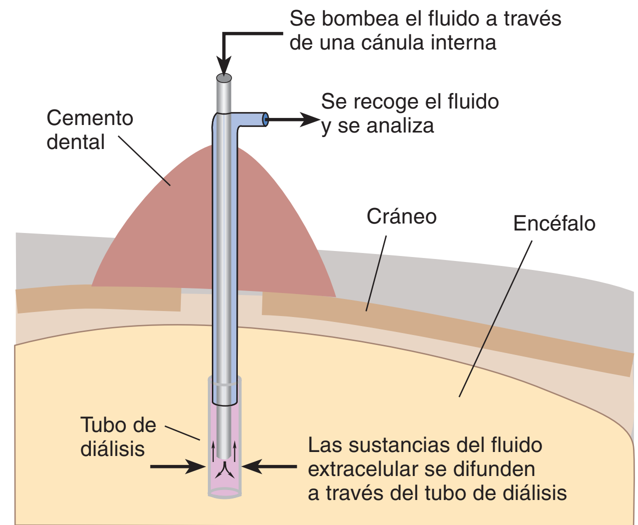


figura 5.28

Microdiálisis. Se administra lentamente una solución salina diluida en el tubo de microdiálisis, donde capta moléculas del líquido extracelular que se difunden en él. Luego se analiza el contenido del tubo.

(Modificado de Hernández, L.; Stanley, B. G. y Hoebel, B. G. *Life Sciences*, 1986, 39, 2629-2637).

Para implantar un tubo de microdiálisis en el encéfalo de la rata se utiliza cirugía estereotáxica de forma que la punta de la sonda se sitúe en la región en la cual se está interesado. Se bombea una pequeña cantidad de una solución similar al líquido extracelular hacia el tubo de diálisis a través de uno de los pequeños tubos de metal. El líquido circula por el tubo de diálisis y pasa al segundo tubo de metal, de donde se recoge para analizarlo. Al pasar el líquido por el tubo de diálisis, arrastra moléculas del líquido extracelular del encéfalo, las cuales son empujadas a través de la membrana por la fuerza de difusión.

El contenido del líquido que ha pasado al tubo de diálisis se examina mediante un método analítico extremadamente sensible. Este método es tan sensible que puede detectar neurotransmisores (y sus productos de degradación) que han sido liberados por los botones terminales y se han dispersado desde el espacio sináptico al resto del líquido extracelular. De hecho, se observa que la cantidad

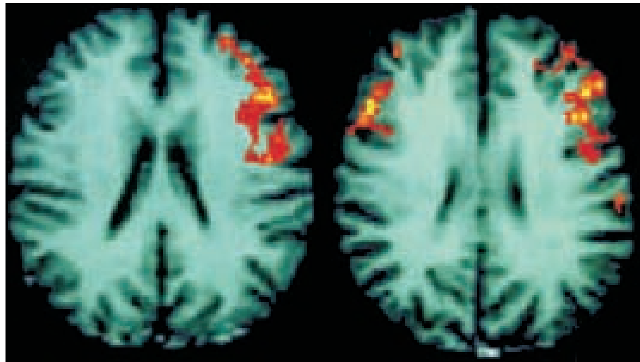
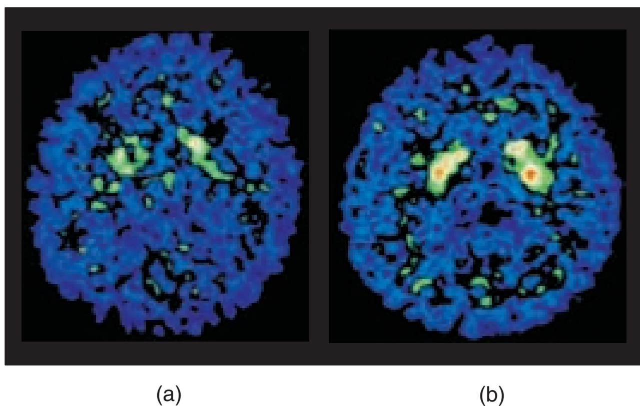


figura 5.27

RM funcional de un encéfalo humano. Se observa un aumento localizado de la actividad neural en varones (izquierda) y mujeres (derecha) mientras juzgaban qué pares de palabras escritas rimaban.

(De Shaywitz, B, A. y cols., *Nature*, 1995, *373*, 607-609. Reproducido con permiso).

microdiálisis Procedimiento para analizar sustancias existentes en el líquido intersticial por medio de un pequeño fragmento de tubo, hecho de una membrana semipermeable, que se implanta en el encéfalo.



(a) (b)

figura 5.29

Imágenes de TEP que muestran la recaptación de L-dopa radioactiva en los ganglios basales de pacientes con síntomas de Parkinson inducidos por una sustancia tóxica antes y después de que se le hiciera un trasplante de neuronas dopaminérgicas fetales. (a) Imagen antes de la operación. (b) Imagen obtenida 13 meses después de la intervención. El aumento de captación de L-dopa indica que el trasplante fetal estaba segregando dopamina. (Modificado de Widner, H., Tetrud, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O. y Langston, J. W. *New England Journal of Medicine*, 1992, 327, 1556-1563. Imágenes reproducidas con permiso).

de acetilcolina presente en el líquido extracelular de núcleos del *bulbo* aumenta durante el sueño REM.

En unos cuantos casos especiales (por ejemplo, al inspeccionar las sustancias químicas que hay en el encéfalo de personas que han sufrido hemorragias endocraneales o traumatismo craneal), se ha aplicado el procedimiento de microdiálisis para estudiar el encéfalo humano; pero razones éticas impiden hacerlo con fines de investigación. Afortunadamente, existe un modo no invasivo de medir sustancias neuroquímicas en el cerebro humano. Pese a que la TEP es un instrumento muy caro, también es muy versátil. Puede utilizarse para localizar *cualquier* sustancia radioactiva que emita positrones.

La figura 5.29 muestra imágenes de TEP del encéfalo del Sr. B., cuyo caso se describió al principio de este capítulo. Se utilizó un aparato estereotáxico para hacerle un injerto de neuronas fetales secretoras de dopamina en los ganglios basales. Como se vio, se obtuvo una imagen de TEP de su encéfalo antes de la cirugía y poco más de un año después. Se le inyectó L-dopa radioactiva una hora antes de cada una de las exploraciones. Como se estudió en el capítulo 4, la L-dopa es captada por los terminales de las neuronas dopaminérgicas, donde se convierte en dopamina; así, la radioactividad observada en las imágenes indica la existencia de terminales que segregan dopamina en los ganglios basales. Las imágenes muestran la cantidad de radioactividad antes (parte a) y después (parte b) de que se le realizara el trasplante. Como puede verse, la cantidad de dopamina en los ganglios basales era sustancialmente más alta después de la cirugía (véase la ***figura 5.29***).

Estimulación de la actividad neural

Hasta aquí, esta sección se ha dedicado a los métodos de investigación que miden la actividad de regiones específicas del encéfalo. Pero a veces se quiere cambiar artificialmente la actividad de dichas regiones para observar qué efectos tienen estos cambios en la conducta del animal. Por ejemplo, las ratas hembra copularán con machos sólo si ciertas hormonas sexuales femeninas están presentes. Si se extirpan los ovarios de la rata, la pérdida de esas hormonas suprimirá su conducta sexual. En anteriores estudios, el autor halló que las lesiones del HVM alteran esta conducta. Tal vez si se *activa* el HVM se compensará la falta de hormonas sexuales femeninas y la rata volverá a copular.

¿Cómo se pueden activar las neuronas? Se puede hacer mediante estimulación eléctrica o química. La estimulación eléctrica implica simplemente pasar una corriente eléctrica a través de un cable insertado en el encéfalo, como se vio en la figura 5.21.La estimulación química por lo general se efectúa inyectando un aminoácido excitatorio, como el ácido caínico o el ácido glutámico, en el encéfalo. Conforme a lo que se explicó en el capítulo 4, el ácido glutámico (glutamato) es el principal neurotransmisor excitatorio en el encéfalo, y ambas sustancias estimulan los receptores glutamatérgicos, activando así las neuronas en donde se localizan estos receptores.

La inyección de sustancias en el encéfalo puede hacerse, mediante un aparato permanentemente unido al cráneo, de modo que la conducta del animal pueda observarse en repetidas ocasiones. Se coloca una cánula de metal (la cánula guía) en el encéfalo del animal, y se fija con cemento su extremo superior al cráneo. Más tarde, se coloca una cánula más fina de una longitud determinada dentro de la cánula guía, y luego se inyecta una sustancia en el encéfalo. Como el animal tiene libertad de movimientos en su entorno, se pueden observar los efectos de la inyección en su conducta (véase la ***figura 5.30***).

El principal inconveniente de la estimulación química es que es algo más compleja que la eléctrica; se requieren cánulas, tubos, bombas o jeringas especiales, y soluciones esterilizadas de aminoácidos excitatorios. No obstante, tiene una clara ventaja sobre la eléctrica: activa los somas celulares, pero no los axones. Puesto que sólo los somas celulares (y por supuesto sus dendritas) contienen receptores glutamatérgicos, se puede estar seguro de que la inyección de un aminoácido excitatorio en una determinada región del cerebro excita las células allí localizadas, pero no los axones de otras neuronas que llegan a pasar por la región. Así pues, los efectos de la estimulación química son más circunscritos que los de la estimulación eléctrica.

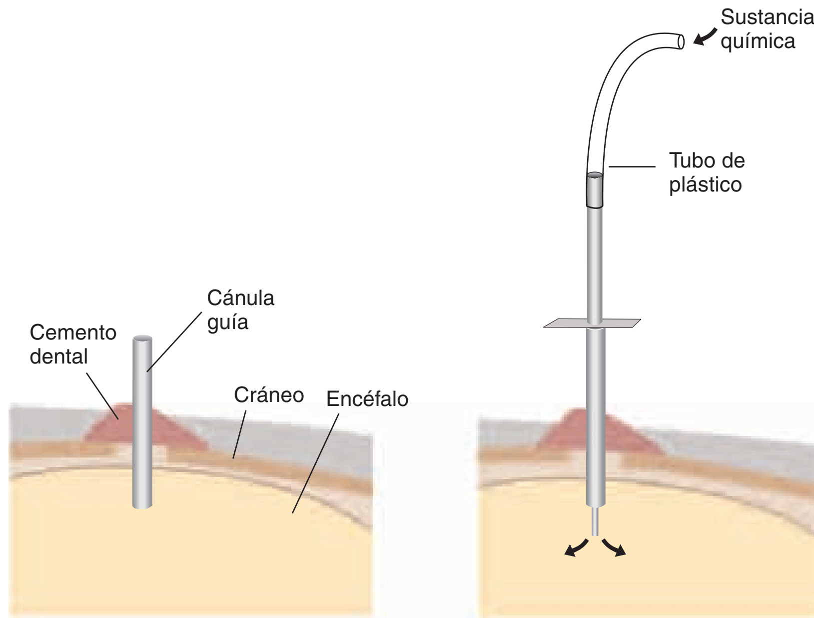


figura 5.30

Cánula intracraneal. Se fija permanentemente al cráneo una cánula guía y posteriormente puede insertarse a su través en el encéfalo una cánula más estrecha.
Mediante este dispositivo pueden infundirse sustancias en el encéfalo.

Como se habrá notado, se acaba de decir que el ácido caínico, descrito antes como una neurotoxina, puede utilizarse para estimular a las neuronas. Estas dos aplicaciones en realidad no son contradictorias. El ácido caínico produce lesiones excitotóxicas al estimular las neuronas hasta su muerte. Mientras que las dosis altas de una solución concentrada destruyen las neuronas, las dosis bajas de una solución diluida sólo las estimula.

¿Qué sucede con los resultados del experimento que se estaba exponiendo? De hecho (como se verá en el capítulo 10), la estimulación del HVM *sustituye* a las hormonas sexuales femeninas. Luego, quizá las hormonas sexuales femeninas ejerzan sus efectos en dicho núcleo. En la sección final de este capítulo se verá cómo comprobar esta hipótesis.

Cuando se inyectan sustancias en el encéfalo a través de cánulas, las sustancias se difunden por una región que implica a cientos (o miles) de neuronas. En ocasiones, se pretende estudiar el efecto de las sustancias sobre la actividad de una neurona individual. Para ello se empleará una técnica conocida como *microiontoforesis.*

Cuando los neurotransmisores se unen con los receptores postsinápticos, los canales iónicos se abren, produciendo potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios. Estos potenciales aumentan o disminuyen la frecuencia de descarga de la célula. Para determinar los efectos de las sustancias transmisoras (o de fármacos que estimulan o bloquean receptores específicos) sobre la actividad de una neurona individual, el investigador utiliza una **micropipeta múltiple**. Este dispositivo consta de dos o más microelectrodos de vidrio (también llamados *micropipetas*), unidos entre sí de forma que sus puntas quedan muy próximas una de otra.

En la figura 5.31 se ilustra una micropipeta de siete unidades ensamblada a un microelectrodo de registro. Cada una de las siete micropipetas puede rellenarse con un neurotransmisor, neuromodulador, hormona o fármaco. El pH (equilibrio ácido-base) de las soluciones contenidas en las micropipetas se ajusta de forma que las sustancias se ionicen. Luego, cuando se hace pasar una corriente eléctrica a través de una de las micropipetas, se descargan algunas moléculas de la sustancia. La inyección de cantidades extremadamente pequeñas de una sustancia siguiendo este procedimiento se denomina **microiontoforesis** (*iontoforesis* significa «transporte de iones», de *pherein*, «llevar o transportar») (véase la ***figura 5.31***).

El microelectrodo de registro detecta la actividad neural de la célula que está siendo expuesta a una de las sustancias que contienen las micropipetas —por ejemplo, un determinado neurotransmisor—. Si la neurona modifica su frecuencia de descarga cuando una cierta cantidad de la hormona es expulsada de la micropipeta, se puede concluir que tiene receptores para dicho neurotranmisor.

micropipeta múltiple Grupo de micropipetas unidas, que se utilizan para infundir diversas sustancias mediante iontoforesis mientras se registra una sola neurona.

microiontoforesis Procedimiento que emplea electricidad para expeler una sustancia de una micropipeta con el fin de determinar los efectos de dicha sustancia en la actividad eléctrica de una célula.

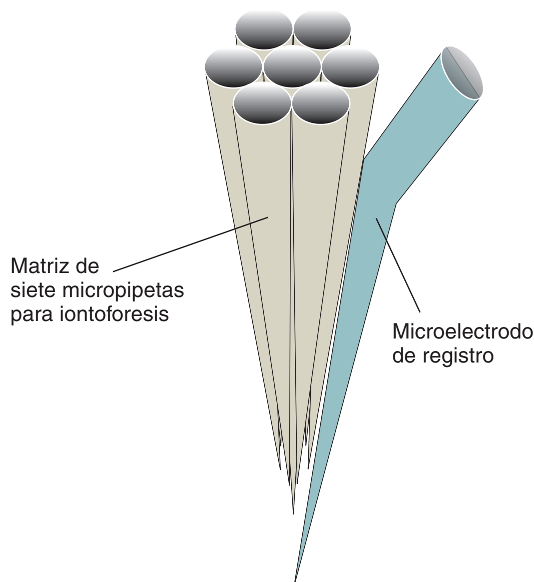


figura 5.31

Microiontoforesis. Mediante una corriente eléctrica, se expulsan moléculas de diferentes sustancias de las siete micropipetas Los microelectrodos de registro recogen la actividad de la neurona y determinan si responde a la sustancia.

Efectos comportamentales de la estimulación eléctrica cerebral

La estimulación del encéfalo de un animal con libertad de movimientos suele producir cambios en su conducta. Por ejemplo, la estimulación del hipotálamo puede inducir conductas como comer, beber, acicalarse, atacar o huir, lo cual sugiere que éste interviene en su control. La estimulación de una zona determinada del núcleo caudado a menudo detiene la conducta que se está realizando, lo cual sugiere que este núcleo está implicado en la inhibición motora. La estimulación cerebral puede actuar como señal para realizar una tarea aprendida o incluso como un refuerzo o un castigo, como se verá en el capítulo 13.

Interpretar el significado de los efectos de la estimulación cerebral es algo problemático, especialmente cuando se trata de estimulación eléctrica. Un estímulo eléctrico (por lo general, una serie de pulsos) nunca puede reproducir los procesos neurales naturales que suceden en el encéfalo. La estimulación artificial de un área desorganiza la interacción normal de los patrones espaciales y temporales de excitación e inhibición. La estimulación eléctrica cerebral probablemente sea tan natural como atarles los brazos a los componentes de una orquesta y luego soltarlos al mismo tiempo para ver qué pueden tocar. De hecho, algunas veces se utiliza estimulación local para producir una «lesión temporal», lo cual hace que la región afectada quede fuera de servicio debido a la falta de sentido de la estimulación artificial.

Lo sorprendente es que este tipo de estimulación en ocasiones *produce* cambios de conducta estructurados. Esto sucede cuando la estimulación tiene lugar en regiones del encéfalo que ejercen una función moduladora sobre circuitos neurales localizados en otras partes del encéfalo. Por ejemplo, los axones de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal inervan gran parte de la corteza cerebral. Si se estimula artificialmente a estas neuronas, la extensa liberación de acetilcolina activa la corteza cerebral y facilita que en ella tenga lugar el procesamiento de información.

Como se vio antes en este capítulo, la actividad neural induce campos magnéticos que pueden detectarse mediante magnetoencefalografía. De modo parecido, pueden emplearse campos magnéticos para estimular neuronas induciendo corrientes eléctricas en el tejido cerebral. La **estimulación magnética transcraneal (EMT)** usa una bobina electromagnética, normalmente dispuesta con la forma del número 8, para estimular neuronas de la corteza cerebral. La bobina de estimulación se coloca sobre el cráneo de modo que el punto de cruce en medio del 8 se localice justo encima de la región que se quiere estimular. Los pulsos de actividad eléctrica envían campos magnéticos que activan las neuronas corticales. Los efectos son muy parecidos a los de la estimulación directa del encéfalo al descubierto. Por ejemplo, como se verá en el capítulo 6, la estimulación de una región delimitada de la corteza visual de asociación alterará la capacidad de una persona para detectar el movimiento de los estímulos visuales. Por otra parte, la EMT se ha utilizado para tratar los síntomas de trastornos mentales como la depresión.

En la figura 5.32 se muestra la bobina electromagnética que se utiliza en la estimulación magnética transcraneal y cómo se coloca sobre la cabeza de la persona (véase la ***figura 5.32***).

estimulación magnética transcraneal Estimulación de la corteza cerebral mediante campos magnéticos, que se producen aplicando pulsos eléctricos a través de una bobina electromagnética situada en una zona próxima del cráneo; interfiere en las funciones de la región cerebral que es estimulada.



(a)



(b)

figura 5.32

Estimulación magnética transcraneal.
(a) Bobina utilizada para aplicar la estimulación.
(b) Ilustración del uso de la bobina. Los cables en la cara del hombre suministran energía eléctrica a los diodos que emiten luz, los cuales constituyen puntos de referencia para seguir los movimientos de la cabeza.

(Fotografías por cortesía de Michael Leventon y el *MIT DI Laboratory*).

resumen intermedio

Registro y estimulación de la actividad neural

Cuando los circuitos neuronales desempeñan sus funciones habituales, su actividad eléctrica y metabólica, y sus secreciones químicas aumentan. Así pues, observando estos procesos cuando un animal percibe diferentes estímulos o emprende diversas conductas, se pueden sacar algunas conclusiones acerca de las funciones que realizan diferentes regiones cerebrales. La actividad eléctrica de neuronas individuales puede registrarse mediante microelectrodos. Los registros crónicos requieren unir el electrodo a un zócalo eléctrico, el cual se fija al cráneo por medio de un adhesivo plástico. Los macroelectrodos registran la actividad de amplios grupos de neuronas. En pocas ocasiones dichos electrodos se sitúan en el interior del encéfalo humano, sino que lo más frecuente es que se coloquen sobre el cuero cabelludo y su actividad se registre por medio de un polígrafo.

La actividad metabólica puede medirse inyectando al animal 2-DG radioactiva, la cual se acumula en las neuronas metabólicamente activas. La autorradiografía detecta la presencia de radioactividad: se colocan secciones encefálicas sobre portaobjetos, se recubren con una emulsión fotográfica, se dejan reposar cierto tiempo y luego se revelan como los negativos fotográficos. Cuando las neuronas son estimuladas sintetizan la proteína nuclear Fos. La presencia de Fos, puesta de manifiesto por un método especial de tinción, aporta otra vía para descubrir cuáles son las regiones activas del encéfalo. La actividad metabólica de diversas regiones del cerebro humano vivo puede evidenciarse con el método de 2-DG, pero para detectar las regiones activas se utiliza un equipo de TEP

Las secreciones de neurotransmisores y neuromoduladores pueden medirse implantando la punta de una sonda de microdiálisis en una región específica del encéfalo. Para realizar observaciones similares en el encéfalo humano puede utilizarse una exploración con TEP.

Los investigadores pueden estimular distintas regiones del encéfalo implantando un macroelectrodo y aplicando una estimulación eléctrica moderada. Alternativamente, pueden implantar una cánula guía en el encéfalo; cuando el animal se ha recuperado de la intervención quirúrgica, insertan una cánula más fina e inyectan una débil solución de un aminoácido excitatorio en el encéfalo. La ventaja de este procedimiento es que sólo son estimuladas aquellas neuronas cuyos somas celulares se localizan en las proximidades de la cánula; los axones que atraviesan la región no resultan afectados.

La **tabla 5.2** recoge los métodos de investigación presentados en este apartado.

Métodos neuroquímicos

Ya se han descrito aquí algunos métodos neuroquímicos al tratar la lesión o la estimulación del encéfalo o la medida de la actividad neural. En esta sección se describen otros varios métodos neuroquímicos que son útiles para estudiar la fisiología de la conducta.

tabla 5.2

Métodos de investigación: Parte II		
OBJETIVO DEL MÉTODO	**MÉTODO**	**OBSERVACIONES**
Registrar la actividad eléctrica de neuronas aisladas	Microelectrodos de vidrio o de metal	Puede hacerse una implantación crónica de microelectrodos de metal para registrar la actividad neural del animal cuando se mueve
Registrar la actividad eléctrica de regiones del encéfalo	Macroelectrodos de metal	En seres humanos, por lo general se pegan al cuero cabelludo con una pasta especial
Registrar los campos magnéticos inducidos por la actividad neural	Magnetoencefalografía; utiliza un neuromagnetómetro, que contiene una matriz con SQUIDs	Puede determinar la localización de un grupo de neuronas que descargan sincronizadamente
Registrar la actividad metabólica de regiones del encéfalo	Autorradiografía con 2-DG	Mide el consumo local de glucosa
	Medida de la proteína Fos	Identifica las neuronas que han sido estimuladas recientemente
	TEP con2-DG RM funcional	Mide la actividad metabólica regional del encéfalo humano
Medir los neurotransmisores y neuromoduladores liberados por las neuronas	Microdiálisis	Pueden analizarse una amplia variedad de sustancias
Medir las sustancias neuroquímicas en el encéfalo humano vivo	TEP	Puede localizar cualquier sustancia radioactiva en el encéfalo humano
Estimular la actividad neural	Estimulación eléctrica	Estimula las neuronas cercanas a la punta del electrodo y los axones que atraviesan la región
	Estimulación química con un aminoácido excitatorio	Estimula sólo las neuronas próximas a la punta de la cánula, no los axones que atraviesan la región
	Estimulación magnética transcraneal	Estimula las neuronas de la corteza cerebral humana con una bobina electromagnética situada sobre la cabeza

Detección de neuronas que producen sustancias neuroquímicas específicas

Supóngase que se averigua que una determinada sustancia química afecta a la conducta. ¿Cómo se podría llegar a descubrir los circuitos neurales responsables de los efectos de la sustancia? Para responder a esta pregunta, se pondrá un ejemplo concreto. Los médicos revelaron hace varios años que los granjeros que habían estado expuestos a determinados tipos de insecticidas (organofosfatos) tenían ensueños particularmente intensos y extraños, e incluso decían tener alucinaciones cuando estaban despiertos. Una posible explicación de estos síntomas es que la sustancia estimula los circuitos neurales que median los sueños. (Al fin y al cabo, los sueños son alucinaciones que se tienen estando dormido). Otra posibilidad es que la sustancia altere los mecanismos inhibitorios que *impiden* que se tengan ensueños mientras se está despierto. Hay datos (que no se describirán aquí) a favor de que la primera hipótesis es la correcta: los insecticidas del tipo de los organofosfatos activan directamente los circuitos neurales responsables de los sueños.

La primera pregunta a plantearse es cómo operan los insecticidas de este tipo. Los farmacólogos tienen la respuesta: estas sustancias inhiben la acetilcolinesterasa. Como se estudió en el capítulo 4, los inhibidores de la acetilcolinesterasa son potentes agonistas colinérgicos. Al inhibir la AChE, estas sustancias frenan la rápida destrucción de ACh después de que haya sido liberada por los botones terminales, y así prolongan el tiempo durante el que se dan potenciales postsinápticos en las sinapsis colinérgicas.

Ahora que se conoce la acción de los insecticidas, se sabe que estas sustancias actúan a nivel de las sinapsis colinérgicas. ¿Qué métodos neuroquímicos se deberían utilizar para descubrir el lugar de acción de estas sustancias en el encéfalo? Existen tres posibilidades: se podrían buscar neuronas que contienen acetilcolina, se podría buscar la enzima acetilcolinesterasa (la cual ha de estar presente en las membranas postsinápticas de las células que reciben aferencias sinápticas de las neuronas colinérgicas), o



figura 5.33

Localización de un péptido mediante inmunocitoquímica. La microfotografía muestra parte de una sección frontal a través del prosencéfalo de una rata. Las fibras doradas y ocres son axones y botones terminales que contienen vasopresina, un neurotransmisor peptídico.
(Cortesía de Geert DeVries, Universidad de Massachusetts).

se podrían buscar receptores de acetilcolina. A continuación se examinan estos tres métodos.

En primer lugar, se considerarán los métodos mediante los que se pueden localizar sustancias neuroquímicas específicas, como los neurotransmisores y los neuromoduladores. (En nuestro caso, interesa la acetilcolina). Hay tres modos básicos de localizar sustancias neuroquímicas en el encéfalo: localizar las *sustancias* mismas, localizar las *enzimas* que las sintetizan, o localizar el ARN *mensajero* involucrado en su síntesis.

Los péptidos (o las proteínas) pueden localizarse directamente por medio de métodos inmunocitoquímicos, que se describieron en la primera sección de este capítulo. Se exponen secciones de tejido cerebral a un anticuerpo para el péptido, asociado a un tinte (por lo general, uno fluorescente). Después se examinan las secciones al microscopio, usando luz de una determinada longitud de onda. Por ejemplo, en la figura 5.33 se ve la localización en el prosencéfalo de axones que contienen vasopresina, un neurotransmisor peptídico. En ella se muestran dos conjuntos de axones. Uno, agrupado en torno al tercer ventrículo en la base del cerebro, aparece en color pardo. El otro, disperso en el área septal lateral, tiene el aspecto de cadenas de fibras doradas. (Como puede verse, una sección cerebral bien teñida puede ser bonita.) (véase la ***figura 5.33***).

Pero lo que interesa aquí es la acetilcolina, que no es un péptido. Por ello, no se pueden utilizar métodos inmunocitoquímicos para localizar este neurotransmisor. Aun así, dichos métodos pueden usarse para localizar la enzima que lo sintetiza. La síntesis de acetilcolina se logra gracias a la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Por lo tanto, casi con toda seguridad las neuronas que contienen esta enzima segregan ACh. La figura 5.34 muestra neuronas colinérgicas de la protuberancia identificadas mediante inmunocitoquímica; el tejido cerebral se expuso a un anticuerpo de la ChAT unido a un tinte fluorescente (véase la ***figura 5.34***).

Otra forma indirecta de localizar una sustancia es utilizar una técnica conocida como **hibridación *in situ***: todos los péptidos y proteínas (incluidas, por supuesto, todas las enzimas) se sintetizan conforme a la información contenida

hibridación *in situ* Producción de ADN complementario de un ARN mensajero determinado a fin de detectar la presencia del ARN.

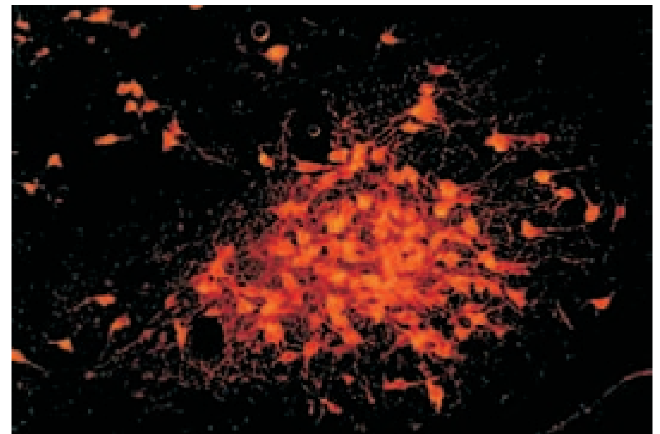


figura 5.34

Localización de una enzima responsable de la síntesis de un neurotransmisor, mediante inmunocitoquímica.
La microfotografía muestra una sección a través de la protuberancia. Las neuronas en color naranja contienen colina acetiltransferasa, lo cual implica que producen (y segregan) acetilcolina.
(Cortesía de David A. Morilak y Roland Ciaranello, Nancy Pritzker *Laboratory of Developmental and Molecular Neurobiology*, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine).

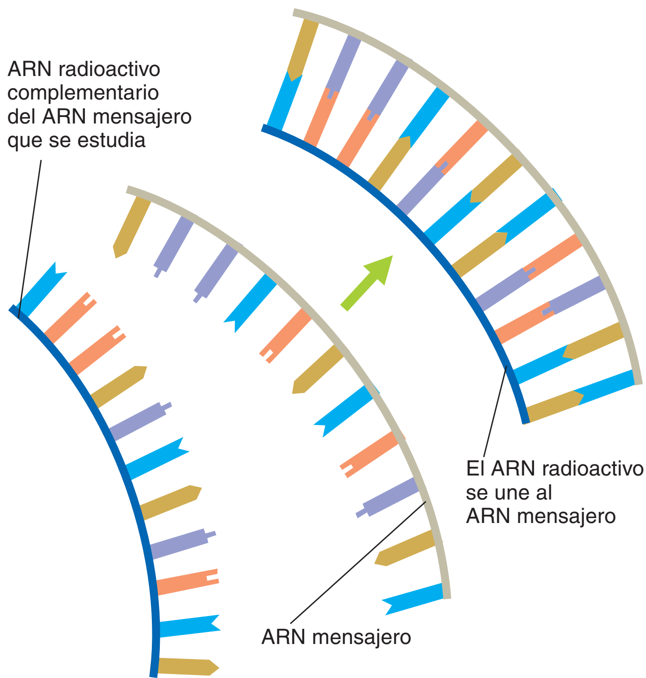


figura 5.35

Explicación del procedimiento de la hibridación *in situ* para localizar el ARN mensajero responsable de la síntesis de una proteína o un péptido determinados.

en los cromosomas. Como se vio en el capítulo 2, cuando se va a sintetizar una proteína concreta, la información necesaria se copia a de un cromosoma en un segmento de ARN mensajero, el cual sale del núcleo y se desplaza hasta los ribosomas, donde tiene lugar la síntesis de proteínas. (Este proceso se ilustró en la figura 2.6.) La «fórmula» (estructura química) de la proteína está codificada en términos de una secuencia específica de bases de nucleótidos que componen el ARN mensajero. Si se conoce este código (y en la mayoría de los casos es así), los biólogos moleculares pueden sintetizar un segmento de ARN radioactivo que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia del ARN mensajero. Las secciones de tejido cerebral se exponen al ADN radioactivo, que se adhiere a las moléculas del ARN mensajero apropiado. Se utilizan entonces la autorradiografía (descrita en la segunda sección de este capítulo) para poder ver dónde se localiza el ARN mensajero y, por deducción, la de las células que producen la proteína cuya síntesis inicia el ARN.

La figura 5.35 explica con un gráfico el método de hibridación *in situ*, y la figura 5.36 muestra la localización del ARN mensajero responsable de la síntesis de un péptido, la vasopresina, puesta de manifiesto mediante este método. La iluminación lateral de los portaobjetos para el microscopio hace que los gránulos de plata de la emulsión fotográfica aparezcan como puntos blancos (véanse las ***figuras 5.35 y 5.36***).

Localización de receptores específicos

Como se vio en capítulos anteriores, los neurotransmisores, los neuromoduladores y las hormonas transfieren sus mensajes a las células sobre las que actúan uniéndose a receptores. La localización de estos receptores puede determinarse siguiendo dos procedimientos diferentes.

En uno, se utiliza la autorradiografía. Se exponen secciones de tejido cerebral a una solución que contiene un ligando radioactivo para un receptor específico. Después se enjuagan las secciones, de manera que la única radioactividad que queda en ellas es la de las moléculas del ligando que se ha unido a sus receptores. Por último, se utilizan métodos autorradiográficos para localizar el ligando radioactivo —y, por tanto, los receptores—. En la figura 5.37 se presenta un ejemplo de los resultados de este procedimiento. Puede verse el autorradiograma de una sección del encéfalo de una rata que se bañó en una solución con morfina radioactiva, la cual se unió a los receptores para los opioides del encéfalo (véase la ***figura. 5.37***).

En el segundo procedimiento se aplica la inmunocitoquímica. Los receptores son proteínas, por lo tanto se pueden producir anticuerpos frente a ellos. Se exponen las secciones de tejido cerebral al anticuerpo adecuado (marcado con un tinte fluorescente) y se observan las secciones al microscopio bajo luz de una determinada longitud de onda.

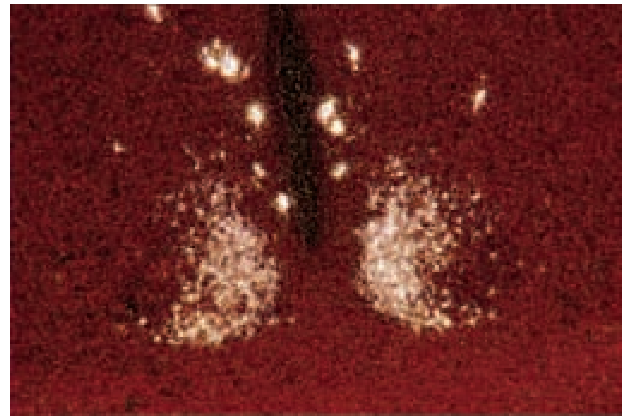


figura 5.36

Hibridación *in situ*. Se expuso el tejido a ARN radioactivo, el cual se une al ARN mensajero responsable de la síntesis de vasopresina, un péptido. La localización del ARN radioactivo, puesta de manifiesto por la autorradiografía, puede verse como puntos blancos. Las neuronas marcadas se localizan en el par de núcleos del hipotálamo.
(Cortesía de Geert DeVries, Universidad de Massachusetts).

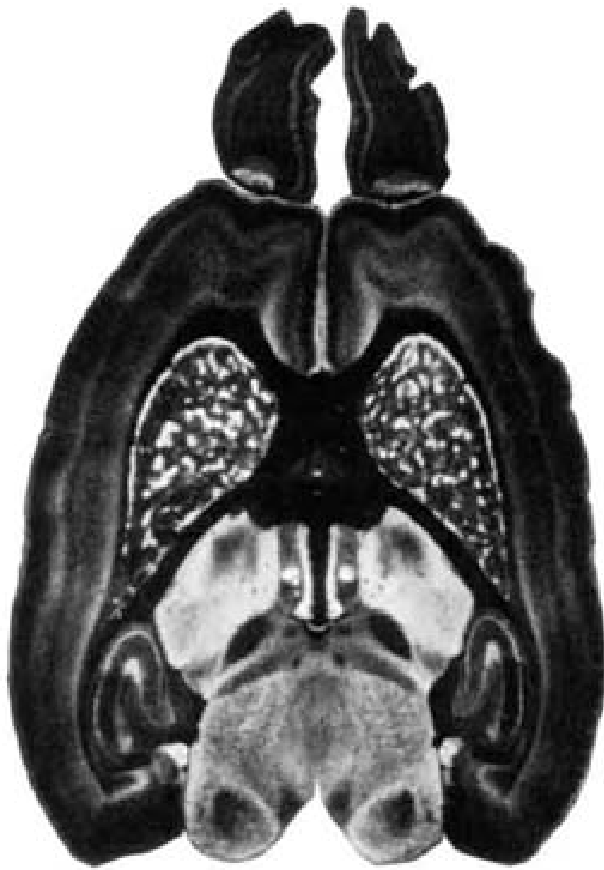


figura 5.37

Autorradiografía del encéfalo de rata (sección horizontal, la zona rostral se sitúa arriba) introducido en una estufa de incubación con una solución que contiene morfina radioactiva, un ligando para los receptores de opioides. Los receptores se destacan como áreas blancas.

(De Herkenham, M. A. y Pert, C. B. *Journal of Neuroscience*, 1982, *2*, 1129-1149.)

Aplíquese el método de localización de receptores a la primera línea de investigación que se consideró antes en este capítulo: la función del hipotálamo ventromedial (HVM) en la conducta sexual de las ratas hembra. Según se vio, las lesiones del HVM abolen esta conducta. También se vio que la conducta no ocurre si se extirpan los ovarios de la rata, pero que puede activarse estimulando el HVM eléctricamente o con aminoácidos excitatorios. Estos resultados sugieren que las hormonas sexuales producidas por los ovarios actúan sobre las neuronas del HVM.

Dicha hipótesis sugiere dos experimentos. Primero, se podría utilizar el procedimiento representado en la figura 5.30 para inyectar una pequeña cantidad de la hormona sexual adecuada en el HVM de ratas hembra cuyos ovarios se han extirpado previamente. Como se verá en el capítulo 10, este procedimiento funciona; la hormona *reactiva* la conducta sexual del animal. En un segundo experimento se podría utilizar la técnica de autorradiografía para buscar los receptores de la hormona sexual. Se expondrían secciones del encéfalo de la rata a la hormona radioactiva, se enjuagarían, y se efectuaría la autorradiografía. Si se hiciera esto, se encontraría efectivamente radioactividad en el HVM. (Y si se compararan las secciones cerebrales de ratas macho y hembra, se obtendrían pruebas de la existencia de un mayor número de receptores hormonales en los encéfalos de las hembras.) También se podría utilizar la inmunocitoquímica para localizar los receptores de las hormonas, y se conseguirían los mismos resultados.

Una provechosa particularidad de los diversos métodos de localización de sustancias neuroquímicas es que se pueden combinar con marcadores anterógrados y retrógrados. Así, los investigadores no sólo pueden determinar cuáles son las sustancias químicas que contiene una determinada neurona, sino también las conexiones de esa neurona con otras zonas del encéfalo. Este método se denomina **doble marcado**. La figura 5.38 muestra un grupo de neuronas de la sustancia gris periacueductal. Las células que aparecen en marrón se han teñido mediante un método de inmunocitoquímica que revela la presencia de receptores de una hormona sexual femenina. Los botones terminales que establecen sinapsis con esas neuronas se han teñido con PHA-L, inyectada en el HVM. Estos resultados revelan que las neuronas de la sustancia gris periacueductal que son sensibles a los estrógenos (hormonas sexuales femeninas) reciben asimismo aferencias del núcleo ventromedial del hipotálamo (véase la ***figura 5.38***).

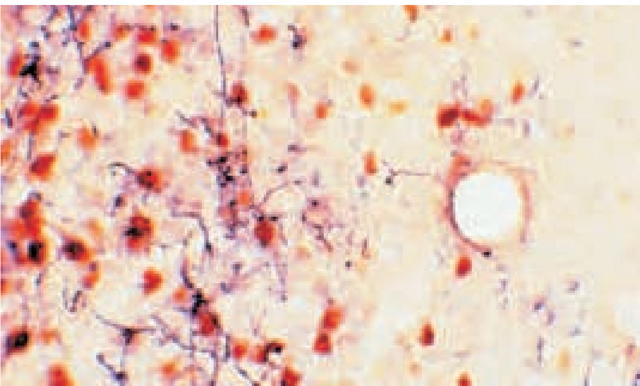
resumen intermedio

Métodos neuroquímicos

Los métodos neuroquímicos pueden utilizarse para determinar la localización de una enorme variedad de sustancias en el encéfalo. Con ellos se pueden identificar las neuronas que segregan un neurotransmisor o un neuromodulador determinado, y aquellas que tienen receptores que responden a la presencia de estas sustancias. Los péptidos y las proteínas pueden localizarse directamente, mediante métodos inmunocitoquímicos: se expone el tejido a un anticuerpo que está unido a una molécula que se hace fluorescente bajo una luz de una determinada longitud de onda. Pueden detectarse otras sustancias mediante la localización inmunocitoquí-

doble marcado Marcado de las neuronas de una región determinada por dos medios diferentes: por ejemplo, utilizando un marcador anterógrado y un marcador para una enzima determinada.

figura 5.38



Técnica de doble marcado mediante inmunocitoquímica y marcado anterógrado. La microfotografía muestra una sección a través de la sustancia gris periacueductal del conejillo de Indias. El tejido se ha tratado con un anticuerpo de la proteína receptora de estrógenos; y la tinción unida al anticuerpo resalta dichos receptores en marrón. Los axones y los botones terminales que aparecen en morado están marcados con PHA-L, inyectada en el núcleo ventromedial del hipotálamo.
(Cortesía de Kirsten Nielsen Ricciardi y Jeffrey Blaustein, Universidad de Massachusetts).

mica de una enzima que se requiere para su síntesis. Asimismo, los péptidos y las proteínas pueden localizarse por medio del método de hibridación *in situ*, el cual revela la presencia del ARN mensajero que dirige su síntesis.

Los receptores de las sustancias neuroquímicas pueden localizarse de dos formas. El primer método utiliza la autorradiografía para poner de manifiesto la distribución de un ligando radioactivo, al cual se ha expuesto el tejido. El segundo método utiliza la inmunocitoquimica para detectar la presencia de los receptores mismos, que son proteínas. Combinando métodos de tinción se pueden localizar neuronas que tienen un receptor determinado o un péptido determinado y que asimismo establecen conexiones con regiones determinadas del encéfalo.

En la **tabla 5.3** se ofrece un compendio de los métodos de investigación presentados en este apartado.

Métodos genéticos

Toda conducta está determinada por interacciones entre el encéfalo de un individuo y su entorno. Muchas características comportamentales —como el talento, las variables de personalidad y los trastornos mentales— parecen venir de familia. Esto sugiere que los factores genéticos pueden ser un factor importante en el desarrollo de diferencias fisiológicas que, en última instancia, son responsables de dichas características. En algunos casos, la relación con factores genéticos está muy clara: un gen defectuoso interfiere en el desarrollo cerebral, y una anomalía neurológica provoca alteraciones comportamentales. En otros casos, la relación entre herencia y conducta es mucho más sutil, y para evidenciarla han de emplearse métodos genéticos especiales.

tabla 5.3

Métodos de investigación : Parte III

OBJETIVO DEL MÉTODO	MÉTODO	OBSERVACIONES
Identificar neuronas que producen un neurotransmisor o neuromodulador determinado	Localización por inmunocitoquímica de un péptido o una proteína	Requiere un anticuerpo específico
	Localización por inmunocitoquímica de la enzima responsable de la síntesis de una sustancia	Útil si la sustancia no es un péptido o una proteína
Identificar neuronas que contienen un tipo de receptor particular	Localización mediante autorradiografía de ligandos radioactivos	
	Localización inmunocitoquímica de receptores	Requiere un anticuerpo específico
Identificar neuronas que producen un neurotransmisor determinado o contienen un tipo de receptor específico; también identificar sus conexiones con otras neuronas de una región cerebral específica	Combinación de cualquiera de los métodos arriba citados con métodos de marcado anterógrado o retrógrado	Proporciona información detallada acerca de las conexiones de tipos específicos de neuronas

Estudios con gemelos

Un método muy eficaz para evaluar la influencia de la herencia en un rasgo concreto consiste en comparar el *índice de concordancia* de este rasgo en pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos. Los gemelos monocigóticos (idénticos) tienen un genotipo idéntico: es decir, sus cromosomas, y los genes que contienen, son idénticos. Por lo contrario, la semejanza genética entre gemelos dicigóticos (fraternales) es, por término medio, del 50 por ciento. Los investigadores estudian las historias clínicas para identificar pares de gemelos en los que al menos uno de ellos tenga el rasgo —por ejemplo, el diagnóstico de un determinado trastorno mental—. Si a ambos gemelos se les ha diagnosticado este trastorno, se dice que son *concordantes.* Si sólo uno de ellos ha recibido este diagnóstico, se dice que son *discordantes.* Así pues, si un trastorno tiene una base genética, el porcentaje de gemelos monocigóticos que son concordantes en cuanto al diagnóstico será superior al de los dicigóticos. Por ejemplo, como se verá en el capítulo 16, el índice de concordancia para la esquizofrenia en gemelos es al menos cuatro veces mayor en los monocigóticos que en los dicigóticos, dato que aporta una sólida prueba de que la esquizofrenia es un rasgo hereditario. Los estudios con gemelos han hallado que los factores genéticos influyen en muchas características individuales, entre ellas rasgos de personalidad, prevalencia de la obesidad, incidencia del alcoholismo y una amplia serie de trastornos mentales.

Estudios sobre adopción

Otro método para evaluar el carácter hereditario de un rasgo de comportamiento concreto es comparar personas que fueron adoptadas en una época temprana de la vida con sus padres biológicos y sus padres adoptivos. Todos los rasgos de comportamiento están influidos en cierto grado por factores hereditarios, factores ambientales y una interacción entre factores hereditarios y ambientales. Los factores ambientales son tanto de tipo social como biológico. Por ejemplo, la salud de la madre, su nutrición o el consumo de drogas durante el embarazo son factores ambientales prenatales; y la dieta del niño, su atención médica y su entorno social (tanto dentro como fuera del hogar) son factores ambientales postnatales. Si un niño es adoptado poco después de nacer, la mayoría de los factores ambientales postnatales estarán relacionados con los padres adoptivos; los factores genéticos lo estarán con los padres biológicos, y los factores ambientales prenatales con la madre biológica.

Los estudios de adopción requieren que el investigador conozca la identidad de los padres de las personas que se están estudiando y pueda evaluar el rasgo comportamental en los padres biológicos y en los adoptivos. Si los individuos estudiados se parecen notablemente a sus padres biológicos, se llega a la conclusión de que el rasgo probablemente esté influido por factores genéticos. Para asegurarse, se han de descartar posibles diferencias en el entorno prenatal de los niños adoptados. Si, en vez de ello, los individuos se parecen a sus padres adoptivos, se concluye que el rasgo está influido por factores ambientales. (Habrá que realizar más estudios para determinar cuáles podrían ser exactamente estos factores ambientales). Por supuesto, es posible que intervengan tanto los factores hereditarios como los ambientales, en cuyo caso los individuos estudiados se parecerán tanto a los padres adoptivos como a los biológicos.

Mutaciones dirigidas

Un método desarrollado recientemente ha puesto en manos de los neurocientíficos una poderosa arma. Las **mutaciones dirigidas** consisten en genes transformados, que se producen en el laboratorio y se insertan en cromosomas de ratones. Estos genes (también llamados genes *knockout*) son defectuosos —no pueden producir una proteína funcional—. En muchos casos, el objetivo de la mutación es una enzima que controla una reacción química específica. Por ejemplo, en el capítulo 13 se verá que la falta de una enzima determinada entorpece el aprendizaje. Este dato sugiere que la enzima es parcialmente responsable de cambios en la estructura de sinapsis necesarias para que se de el aprendizaje. En otros casos, el objetivo de la mutación es una proteína que en sí misma desempeña una útil función en la célula. Por ejemplo, en el capítulo 18 se verá que un tipo concreto de receptor para los opioides interviene en los efectos reforzantes y analgésicos de los opioides.

r e s u m e n
i n t e r m e d i o

Métodos genéticos

Dado que los genes dirigen el desarrollo de un organismo, los métodos genéticos resultan de gran utilidad en los estudios de la fisiología de la conducta. Los estudios con gemelos comparan el índice de concordancia de gemelos *monocigóticos* (idénticos) y dicigóticos (fraternales) en cuanto a un rasgo concreto. Un mayor índice de concordancia en los gemelos monocigóticos aporta pruebas de que el rasgo está influido por la herencia. En los estudios sobre adopción se compara a individuos adoptados durante la infancia con sus padres biológicos y sus padres adoptivos. Si los individuos se parecen a sus padres biológicos, es prueba de que se debe a factores genéticos. Si se parecen a sus padres adoptivos, es prueba de que intervienen factores del entorno familiar.

Las mutaciones dirigidas permiten a los neurocientíficos estudiar los efectos de la falta de una proteína concreta —por ejemplo, una enzima, una proteína estructural o un receptor— en las características fisiológicas y comportamentales de un animal.

Lecturas recomendadas

Manual de laboratorio

Wellman, P.: *Laboratory Exercises in Physiological Psychology.* Boston: Allyn and Bacon, 1994.

Atlas estereotáxicos

Paxinos, G. y Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 4ª ed.. San Diego, CA: Academic Press, 1998.

Slotnick, B. M. y Leonard, C. M.: A *Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain.* Rockville, MD: Public Health Service, 1975. (U.S. Government Printing Office Stock Number 017-024-00491-0)

Snider, R. S. y Niemer, W. T.: A *Stereotaxic Atlas of the Cat Brain.* Chicago, University of Chicago: Press, 1961.

Swanson, L. W.: *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* Amsterdam: Elsevier, 1992.

Métodos histológicos

Heimer, L. y Záborsky, L.: *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods 2: Recent Progress.* Nueva York, Plenum Press, 1989

Direcciones de internet recomendadas

Online Mendelian Inheritance
(Herencia mendeliana *on line*)

http/www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/

Esta página Web contiene un catálogo on line de genes humanos y trastornos genéticos así como enlaces con otras páginas sobre herencia genética.

Bioscience Research: Methods (Investigación biocientífica: métodos)

http://biochemie.net/links/Methods/

Esta página tiene como tema los protocolos para diversas técnicas de biología molecular.

Tutorial of Functional MRI
(Seminario sobre RM funcional)

http://www.mhri.edu.au/~nab/gregg.html

Esta página proporciona una panorámica para estudiantes especialistas de la técnica de RM funcional así como referencias exhaustivas de la misma.